ANTIBIOTICA AUS ASPERGILLUS FUNICULOSUS
UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND WIRKUNGSWEISE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
DIETER SCHANZ
aus Stuttgart

1978

1977

78 192

ANTIBIOTICA AUS ASPERGILLUS FUNICULOSUS
UNTERSUCHUNGEN ZUR ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND WIRKUNGSWEISE

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
DIETER SCHANZ
aus Stuttgart

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Dezember 1977
Dekan: Professor Dr. K.-P. Hadeler
1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Loeffler
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Zähner

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Professor Dr. W. Loeffler am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Universität Tübingen, durchgeführt.

Den Herren Professoren Dr. W. Loeffler und Dr. H. Zähner danke ich herzlich für ihr stetiges Interesse und ihre Unterstützung.

Bei Herrn Professor Dr. W.A. König, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Hamburg, bedanke ich mich für die Untersuchungen zur Chemie der Ethericine.

Den Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0057

Verwendete Abkürzungen:

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
Con A	Concanavalin A
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E_{578}	Extinktion bei 578 nm und 1 cm Schichtdicke
MIC	Minimale Hemmkonzentration
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MW	Molekulargewicht
NCTC	National Collection of Type Cultures, London, GB
PEG	Polyäthylenglykol
Poly Phe	Phenylalanin Polypeptid
Poly U	Polyuridylsäure
POPOP	2,2'-p-Phenyl-bis-(5-phenyloxazol)
PPO	2,5-Diphenyloxazol
rpm	Umdrehungen pro Minute
Tü	Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Universität Tübingen
Upm	Umwürfe pro Minute
v/v	Verhältnis von Volumenteilen

Die übrigen verwendeten Abkürzungen entsprechen den Regeln der IUPAC-IUB (American Society of Biological Chemists, Inc., 1975) und dem internationalen Einheitensystem (Documenta Geigy, 1975).

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1.	Chemikalien und Enzyme	4
2.1.1.	Chemikalien für Nährmedien	5
2.1.2.	Chemikalien für Fermentation und Isolierung	5
2.1.3.	Chemikalien für Charakterisierung und Antagonisierungsversuche	5
2.1.4.	Chemikalien und Enzyme zur Untersuchung der Wirkungsweise	6
2.1.5.	Radiochemikalien	7
2.1.6.	Antibiotica	7
2.2.	Nährmedien	8
2.3.	Organismen	10
2.3.1.	Produzentenstamm	10
2.3.2.	Teststämme	10
2.4.	Methoden zur Herstellung der Antibiotica	11
2.4.1.	Fermentation	11
2.4.2.	Isolierung der Antibiotica	13
2.5.	Methoden zur physikalisch-chemischen Charakterisierung	14
2.5.1.	Dünnschichtchromatographie	14
2.5.2.	Oxidation von Ethericin A	14
2.5.3.	Spektren	14
2.6.	Methoden zur biologischen Charakterisierung	15
2.6.1.	Agardiffusions-Tests mit Bakterien und Pilzen	15
2.6.2.	Verdünnungsreihen-Test	16
2.6.3.	Bioautographie	16
2.6.4.	Versuche mit dem Biophotometer	16
2.7.	Methoden zur Untersuchung der Wirkungsweise	17
2.7.1.	Einbau von markiertem Isoleucin, Uracil, Thymidin und N-Acetylglucosamin	17
2.7.2.	Makromolekülsynthesen in vitro	18
2.7.3.	Differenztest mit *Pichia farinosa*	20
2.7.4.	Methoden zur Untersuchung von Membranwirkungen in vivo	21

Seite

2.7.5. Methoden zur Untersuchung von Membranwirkungen, Vesikelversuche 22

2.7.6. Versuche zur Wechselwirkung mit Ionen 24

2.8. Stimulationsversuche an Mäusemilzzellen 26

3. ERGEBNISSE 27

3.1. Herstellung der Antibiotica 27

3.1.1. Fermentation 27

3.1.2. Isolierung der Antibiotica 27

3.2. Physikalische und chemische Charakterisierung 30

3.2.1. Löslichkeit und Stabilität 30

3.2.2. Dünnschichtchromatographie und Identifizierung 31

3.2.3. Oxidation von Ethericin A 32

3.2.4. Spektren 32

3.2.5. Struktur von Ethericin A und B 35

3.3. Biologische Charakterisierung 36

3.3.1. Wirkungsspektrum 36

3.3.2. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen von Ethericin A und B im Biophotometer 39

3.4. Untersuchungen zur Wirkungsweise der Antibiotica 42

3.4.1. Einfluß von Ethericin A und B auf die Makromolekülsynthesen in vivo 42

3.4.2. Makromolekülsynthesen in vitro 47

3.4.3. Hemmung der Atmungskette - Differenztest mit *Pichia farinosa* 51

3.4.4. Wirkung von Ethericin A und B auf bakterielle Membranen in vivo 52

3.4.5. Wirkung auf die Cytoplasmamembran, Versuche mit Membranvesikeln 56

3.4.6. Wechselwirkung mit Ionen, Versuche in vivo 60

3.4.7. Wechselwirkungen mit Ionen, chemisch-physikalische Untersuchungen 63

3.5. Versuche mit Lymphocyten 65

3.5.1. Einfluß von Ethericin A und B auf den Einbau von [^{3}H]-Thymidin in Mäusemilzzellen 65

3.5.2. Wirkung von Ethericin A auf die Con A-induzierte Stimulation von Mäusemilzzellen 67

4. ANHANG: Natürlich vorkommende Diphenylether 69

		Seite
5.	DISKUSSION	72
5.1.	Diphenylether	72
5.2.	Wirkort und Wirkungsweise von Ethericin A	75
5.3.	Wirkort und Wirkungsweise von Ethericin B	80
5.4.	Das Screening-Modell	82
5.5.	Immunologische Untersuchungen	84
6.	ZUSAMMENFASSUNG	87
7.	LITERATURVERZEICHNIS	89

1. EINLEITUNG

Die bakterielle Zellwand stellt einen Schutz gegen das Eindringen von Molekülen dar. Da die Angriffspunkte vieler Antibiotica im Innern der Zelle liegen, ist diese Permeationsbarriere eine wichtige Ursache bakterieller Resistenz (Costerton und Cheng, 1975). Der Mechanismus dieser Eindringungsresistenz ist noch nicht in allen Einzelheiten bekannt, was zumindest teilweise auf mangelhafte Kenntnisse über den Transport von Antibiotica ins Zellinnere zurückzuführen sein dürfte. Die Aufklärung dieses Problems kann unter anderem durch Permeabilitätsänderungen hervorrufende Resistenzfaktoren zusätzlich erschwert werden (Levy und McMurry, 1974).
Während die Cytoplasmamembranen Gram-positiver und -negativer Bakterien prinzipiell gleich sind, findet man Unterschiede im Aufbau der äußeren Zellwand. Nach Braun (1977) sind darauf die Unterschiede in der Empfindlichkeit Gram-positiver und -negativer Bakterien gegenüber Antibiotica zurückzuführen. Grundsätzlich unterscheidet sich die äußere Membran Gram-negativer Bakterien durch einen hohen Gehalt an Lipid, Glykolipid und Protein von der Gram-positiver Bakterien. Eine zusammenfassende Gegenüberstellung des Aufbaus der Zellwand Gram-positiver und -negativer Bakterien ist bei Costerton und Cheng (1975) zu finden.
Gewisse Substanzen, zum Beispiel Äthylendiamintetraessigsäure, die Chelate vor allem mit zweiwertigen Ionen bildet, sind in der Lage, die äußere Membran Gram-negativer Bakterien zu desintegrieren (Leive, 1974). Dabei verändert EDTA die Zellwand und erhöht infolgedessen die Permeabilität dieser Zelle. Die Veränderung der Zelloberfläche ist bei *Escherichia coli* auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen worden (Bayer und Leive, 1977; Spicer und Spooner, 1974). Gleichzeitig mit diesen Oberflächenveränderungen kann ein Ausfluß von Lipopolysaccharid (LPS) beobachtet werden. Dieser Verlust kann bis zu 50 % der vorhandenen Menge an LPS erreichen und vom Ausfluß von 5 - 20 % Phos-

phatidyläthanolamin und 1 - 2 % Protein begleitet sein (Russell, 1971). Die LPS-Moleküle werden bei intakter Membran durch Ionen oder hydrophobische bzw. ionische Wechselwirkungen an ihrem Platz gehalten, bei Entzug der zweiwertigen Ionen jedoch freigesetzt (Leive, 1974).
Daß vor allem die komplexierenden Eigenschaften der Äthylendiamintetraessigsäure für die Wirkung auf lebende Zellen Bedeutung haben, wurde u.a. aus vergleichenden Untersuchungen mit anderen Komplexbildnern geschlossen; Verbindungen mit höherer Komplexbildungskonstante bewirkten stärkere Effekte, solche mit niedriger Komplexbildungskonstante wirkten schwächer (Haque und Russell, 1974a; Spicer und Spooner, 1974).

Die drastischen Veränderungen der Zellwand sind in machen Fällen von einer erhöhten Sensibilität gegenüber verschiedenen Antibiotica begleitet (Haque und Russell, 1974b; Spicer und Spooner, 1974). Die Frage, ob es sich dabei um einen potenzierenden oder additiven Effekt handelt, wird von den verschiedenen Autoren widersprüchlich beantwortet. Während Haque und Russell (1974a) sowie Neu und Winshell (1970) eine Erniedrigung der minimalen Hemmkonzentration um maximal 50 % beschrieben, konnten Leive (1974) und Russell (1971) potenzierende Effekte zeigen.
Die Wirkung von EDTA auf verschiedene Organismen ist nicht einheitlich. Während Pseudomonadales sehr leicht lysiert werden können, war die Wirkung auf andere Gram-negative Bakterien sehr viel schwächer; ein Zusammenhang mit der Lebensfähigkeit dieser Bakterien war nicht festzustellen (Haque und Russell, 1974a). Bobachtungen an Gram-positiven Bakterien liegen kaum vor. An den wenigen untersuchten Vertretern konnten keine signifikanten Effekte und keine erhöhte Sensibilität festgestellt werden (Neu und Winshell, 1970; Russell, 1971).
Ausgehend von der Überlegung, daß gewisse antibiotisch aktive Substanzen nur mit Permeationshilfsstoffen (EDTA, DMSO) in eine Bakterienzelle eindringen können, wurde ein neues Screening-Modell aufgestellt. Gesucht wurden Antibiotica, die nur mit Hilfe von EDTA in den Testkeim *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57 eindringen können. Später könnte dann versucht werden, diese

sogenannten "football antibiotics" chemisch so zu modifizieren, daß sie ohne Hilfe in die Zelle gelangen.
Grundlage der vorliegenden Arbeit bildeten die Ergebnisse einer Diplomarbeit (Schanz, 1975). Bei der dort beschriebenen Substanz Tü 680/I handelt es sich um den 2,2',3,3'-Tetrahydroxy-5,5'-dimethyldiphenylether, der "Ethericin A" genannt wurde. Ein zweites, vom gleichen Pilzstamm gebildetes Antibioticum, "Ethericin B", konnte als Äthylester eines Dihydroxy-dimethyldiphenylethers identifiziert werden. Die Strukturaufklärungen wurden von Professor Dr. W.A. König, Universität Hamburg, durchgeführt.
Aufgrund der für Antibiotica ungewöhnlichen Struktur scheint es interessant zu sein, die biologischen Eigenschaften und die Wirkungsweise dieser Verbindungen näher zu untersuchen.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1. Chemikalien und Enzyme

Die für diese Arbeit benutzten Substanzen und Präparate wurden von den unten verzeichneten Firmen bezogen. In den folgenden Abschnitten (2.1.1. - 2.1.6.) ist die Herkunft jeweils durch Ziffern gekennzeichnet. Hier nicht aufgeführte Chemikalien (analysenreine Qualität) stammen von E. Merck AG, Darmstadt.

ASID Bonz und Sohn GmbH, Lohhof	(1)
Bayer AG, Wuppertal/Elberfeld	(2)
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim	(3)
Brenntag GmbH, Mülheim/Ruhr	(4)
Calbiochem, R. Päsel KG, Frankfurt	(5)
Ciba, Basel, Schweiz	(6)
Deutsche Maizena Werke GmbH, Hamburg	(7)
Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA	(8)
Fluka AG, Buchs, Schweiz	(9)
Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Universität Tübingen	(10)
E. Merck AG, Darmstadt	(11)
Oxoid Ltd., London, Great Britain	(12)
Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden	(13)
Riedel-de Haën AG, Hannover/Seelze	(14)
Carl Roth OHG, Karlsruhe	(15)
Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg	(16)
Sigma Chemie GmbH, München	(17)
Zinsser Scintillators, Frankfurt	(18)

2.1.1. Chemikalien für Nährmedien

Bacto AC Medium	(8)
Bacto Agar	(8)
Bacto Malt Agar	(8)
Bacto Nutrient Broth	(8)
Bacto Tryptone	(8)
Bacto Yeast Extract	(8)
Dextrose	(7)
Glucose-Monohydrat (Dextro-med.)	(7)
Lab Lemco Powder	(12)
Oxoid Agar No. 1	(12)
(+)-Pantothenat, Calciumsalz	(5)
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	(11)
Pyridoxin-monohydrochlorid	(5)
Thiamin-hydrochlorid	(5)

2.1.2. Chemikalien für Fermentation und Isolierung

Amberlite XAD-2, 300 - 1000 µm	(16)
DC-Alufolien, Kieselgel F 254, Schichtdicke 0,25 mm	(11)
Fertigplatten für PSC	(11)
Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie 0,063 - 0,200 mm (70 - 230 mesh ASTM)	(11)
Niax Polyol LHT 67	(4)
Sephadex LH-20	(13)

2.1.3. Chemikalien für Charakterisierung und Antagonisierungsversuche

Aminosäuren, biogene	(5)
Casamino acids, vitamine free	(8)
Epiandrosteron	(9)

Ergosterin	(9)
Farnesol	(9)
Folsäure	(5)
DL-α-Lecithin	(17)
Linolsäure	(9)
Multi-vitamine	(1)
Phosphatidyläthanolamin	(17)
Stearinsäure	(15)
Tween 80	(16)
Ubichinon 30	(16)
Vitamin A-Acetat	(5)
Vitamin K_1	(9)
Vitamin K_4	(9)
Vitamin K_5	(9)

2.1.4. Chemikalien und Enzyme zur Untersuchung der Wirkungsweise

Albumin krist. (Rinderserum)	(16)
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	(17)
Desoxyribonucleinsäure	(3)
Desoxyribonuclease (DNase from bovine pancreas)	(17)
Lactat-Dehydrogenase (Kaninchenmuskel)	(3)
Lysozym (Hühnereiweiß)	(3)
Nicotinamid-adenin-dinucleotid, freie Säure	(3)
Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert	(3)
Nucleotide, Desoxy-Nucleotide	(3)
L-α-Phosphatidyl choline from egg yolk	(17)
Phosphoenolpyruvat (PEP), mono-Natriumsalz	(3)
Polyuridylsäure (Poly U), Kaliumsalz	(3)
2,2'-Phenyl-bis-(5-phenyloxazol) (POPOP)	(18)
2,5-Diphenyloxazol (PPO)	(18)
Pyruvat-Kinase	(3)
RNA-Polymerase	(3)

Thymidin p.a.	(16)
Trichloressigsäure	(14)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	(14)

2.1.5. Radiochemikalien

Sämtliche Radiochemikalien wurden bezogen von: The Radiochemical Centre, Amersham, Bucks., GB.

2.1.6. Antibiotica

A 22765	(6)
Actinomycin C_1	(6)
Albomycin	(10)
Chloramphenicol	(3)
Desferri-Ferricrocin	(10)
Desferri-Triacetylfusigen	(10)
Enniatin B	(10)
Ferrimycin	(10)
Kirromycin	(10)
Lipomycin	(10)
Magnesidin	(10)
Nonactin	(10)
Oleficin	(10)
Oxytetracyclin	(3)
Penicillin G	(2)
Rifampicin-Natriumsalz	(6)
Streptolydigin	(10)
Tirandamycin A	(10)
Tirandamycin B	(10)
Valinomycin	(10)
Venturicidin B	(10)

2.2. Nährmedien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden die Medien 20 Minuten bei 121° C autoklaviert.

Hefeagar, HA

4 g Hefeextrakt; 10 g Malzextrakt; 4 g Glucose; 20 g Agar; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml; pH 5,5.

Hefeagar, neutralisiert, nHA

Zusätze vgl. HA; mit NaOH pH 7,3 eingestellt.

Maismehl-Medium, MM

50 g Cornmeal; 15 g Agar; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml; pH 6,0.

Malzagar, MA

20 g Malzextrakt; 20 g Agar; ad 1000 ml; pH 6,0.

Medien für den Differenztest mit *Pichia farinosa*; DA, DG

10 g Glucose (für DG) bzw. 10 g Natrium-Acetat (für DA); (für beide Medien:) 2 g $(NH_4)_2SO_4$; 0,64 g $(NH_4)_2HPO_4$; 0,3 g KCl; 0,15 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$; 94 mg $CaCl_2 \times 2\ H_2O$; 0,78 mg $CuSO_4 \times 5\ H_2O$; 4,8 mg $FeCl_3 \times 6\ H_2O$; 3 mg $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$; 3,5 mg $MnSO_4 \times 2\ H_2O$; 0,01 mg Biotin; 20 mg meso-Inosit; 10 mg Ca-Pantothenat; 2 mg Thiamin-HCl; 0,5 mg Pyridoxin; zur Verfestigung 15 % Agar; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml.

Medium für *Clostridium pasteurianum*, AC

3 g Fleischextrakt; 3 g Malzextrakt; 3 g Hefeextrakt; 20 g Pepton aus Casein; 5 g Glucose; 200 mg Ascorbinsäure; 15 g Agar; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml; pH 7,0.

Minimalmedium für Biophotometer-Versuche, MD
(verändert nach Davis und Mingioli, 1950)

3 g KH_2PO_4; 7 g K_2HPO_4; 0,1 g NaCl; 0,1 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$;

1 g $(NH_4)_2SO_4$; 4 g Glucose getrennt sterilisiert; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml.

Nähragar, Komplettmedium für Bakterien, NA

3 g Fleischextrakt; 5 g Pepton; 2,5 g NaCl; 15 g Agar; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml; pH 7,2.

Nutrient Broth, Komplettmedium, NB

8 g Nutrient Broth; 5 g NaCl; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml; pH 7,2.

Raulin-Thom Medium, RT
(Raistrick und Rudman, 1956)

75 g Glucose; 4 g L(+)-Weinsäure; 4 g Diammonium-D-tartrat; 600 mg $(NH_4)_2HPO_4$; 250 mg $(NH_4)_2SO_4$; 600 mg K_2CO_3; 500 mg Magnesiumhydroxidcarbonat; 70 mg $FeSO_4 \times 7\ H_2O$; 70 mg $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$; mit entionisiertem Wasser ad 1500 ml; pH 3,7.

Tartratagar, Minimalmedium, TA

8 g Glucose; 4 g di-Ammoniumtartrat; 5 g NaCl; 2 g KH_2PO_4; 1 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$; 0,2 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$; 0,01 g $MgSO_4 \times H_2O$; 15 g Agar; mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml; pH 7,3.

2.3. Organismen

2.3.1. Produzentenstamm

Aspergillus funiculosus Smith - Tü 680 - CBS 116.56

2.3.2. Teststämme

2.3.2.1. Bakterien

Achromobacter geminiani Ravenel - Institut für Mikrobiologie, Universität Göttingen
Bacillus brevis Migula - ATCC 9999
Bacillus subtilis Cohn - Tü 203
Bacillus subtilis Cohn - ATCC 6051
Clostridium pasteurianum Winogradsky - ATCC 6013
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers - K 12
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers - K12-D22-Normark
Escherichia coli (Migula) Castellani et Chalmers - K12-A19-15-Schwarz
Proteus vulgaris Hauser - NCTC 4157, strain Lehmann
Pseudomonas fluorescens Migula - ATCC 13525
Pseudomonas saccharophila Doudoroff - ATCC 15946
Sarcina lutea Schroeter - ATCC 381
Staphylococcus aureus Rosenbach - Tü 202
Staphylococcus aureus Rosenbach - ATCC 11632
Streptomyces antibioticus (Waksman et Woodruff) Waksman et Henrici - ATCC 1497
Streptomyces viridochromogenes (Krainsky) Waksman et Henrici - Tü 57

2.3.2.2. Pilze

Absidia corymbifera (Cohn) Saccardo et Trotter - Tü 145
Aspergillus fumigatus Fresenius - Tü 149
Botrytis cinerea Persoon ex Fries - Tü 157
Candida albicans (Robin) Berkhout - Tü 164

Curvularia spec. - Tü 627
Microsporum gypseum (Bodin) Guiart et Grigorakis - Tü 282
Mucor miehei Cooney et Emerson - Tü 284
Nadsonia fulvescens (Nadson et Konokotina) Sydow - Tü 561
Paecilomyces variotii Bainier - Tü 137
Pichia farinosa (Lindner) Hansen - Tü 291
Saccharomyces cerevisiae Hansen - Tü 125
Schizosaccharomyces pombe Lindner - Tü 501

2.4. Methoden zur Herstellung der Antibiotica

2.4.1. Fermentation

Für Submerskulturen galten folgende allgemeine Bedingungen: Inkubationstemperatur 27° C, Medium nach Raulin-Thom, Produzent *Aspergillus funiculosus* Smith Tü 680. Bei Bedarf Zugabe weniger Tropfen Polyol. Falls nicht anders angegeben, wurde 20 Minuten bei 121° C sterilisiert.

2.4.1.1. Herstellung einer Sporensuspension

Eine Penicillinflasche (4 l Volumen, 250 ml nHA-Agar) wurde mit 10 ml Sporensuspension (erhalten durch Abschwemmen von 2 Schrägagar-Röhrchen) beimpft und ca. 10 Tage bei 27° C inkubiert. Danach wurden die Sporen mit 100 ml entionisiertem Wasser abgeschwemmt, und die Suspension nach Abfiltrieren von Mycelresten auf 5×10^6 Sporen/ml eingestellt.

2.4.1.2. Kulturen im Erlenmeyer-Kolben

Die Anzucht im Erlenmeyer-Kolben diente vorwiegend der Herstellung von Vorkulturen. Dazu wurden 100 ml Medium RT (500 ml Erlenmeyer-Kolben, 1 seitlicher Einstich) mit 1 ml Sporensuspension beimpft. Auf einer rotierenden Schüttelmaschine (25 mm Bewegungsradius; 120 rpm; A. Kühner, Basel, Schweiz) wurde 50 Stunden inkubiert, die Kolbeninhalte dann vereinigt und zum Animpfen eines Fermenters (10 bzw. 20 l Nutzinhalt) verwendet.

2.4.1.3. Fermentation im 10 l-Maßstab

Der Fermenter (Modell FS-314, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, N.J., USA) wurde nach dem Sterilisieren (9 l Medium, 121° C, 30 min) mit 1 l Vorkultur (10 % des Nutzvolumens) beimpft. Belüftet wurde durch Einblasen von 180 l Luft/h, die Geschwindigkeit des Blattrührers betrug 200 rpm. Nach 100 Stunden konnte der Fermenter geerntet werden. Sollte ein 10 l-Fermenter als Impfgut verwendet werden, wurde die Inkubation nach 50 Stunden abgebrochen.

2.4.1.4. 100 l-Fermentation

Der in situ sterilisierte (30 min, 121° C) 100 l-Fermenter (Modell F-130, New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, N.J., USA) enthielt 90 l Medium, das mit 10 l Vorkultur angeimpft wurde. Die Inkubationsdauer bei 200 rpm (Blattrührer) und 1700 l Luft/h betrug 135 Stunden.

2.4.1.5. 20 l-Fermentation

Dieser Fermentertyp (Modell b 20, AG für Biologische Verfahrenstechnik, Basel; Fabrikation und Verkauf: Giovanola Frères SA., Monthey, Schweiz) arbeitet im Gegensatz zu den oben erwähnten Typen (2.4.1.3. - 2.4.1.4.) mit einem Umwurf-System, durch das erheblich bessere Belüftungswerte erreicht werden können. Sterilisiert wurde in situ, die Impfmenge betrug 10 % des Nutzvolumens. Bei einer Luftzufuhr von 200 l/h und 1200 Upm wurde 120 Stunden fermentiert.

2.4.2. Isolierung der Antibiotica

Zur Trennung von Mycel und Kulturbrühe stand eine Filterpresse (Schenk, Schwäbisch Gmünd) zur Verfügung. Da im Mycel keine antibiotische Aktivität nachzuweisen war, konnte es verworfen werden. Das Kulturfiltrat wurde über eine mit Amberlite XAD-2 gefüllte Säule gegeben, wobei ca. 100 g XAD-2 für einen Liter Kulturfiltrat verwendet wurden. Der Vorlauf, das Waschwasser und die Eluate mit 10 bzw. 20 % Methanol waren inaktiv, die Elution der beiden Antibiotica erfolgte mit Methanol/Wasser = 50/50 (v/v). Zum Auftragen auf eine Kieselgel 60-Säule wurden die aktiven Fraktionen der XAD-Säule mit Äthylacetat extrahiert, getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der im Laufmittel der Kieselgel-Säule (Chloroform/Methanol = 95/5) gelöste Rückstand wurde aufgetragen und die Säule eluiert. Zur weiteren Reinigung wurden die Antibiotica enthaltenden Fraktionen zur Trockene eingeengt, in Methanol aufgenommen und an Sephadex LH-20 chromatographiert.
Nach diesem Reinigungsschritt lag Ethericin A als chromatographisch sauberes Präparat vor; Ethericin B nachdem es aus kaltem Methanol kristallisiert worden war.
Die beiden Antibiotica wurden bei -20° C im evakuierten Exsikkator aufbewahrt.

2.5. Methoden zur physikalisch-chemischen Charakterisierung

2.5.1. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (Stahl, 1967) diente zur Identifizierung und Reinheitsprüfung der zu untersuchenden Substanzen.

2.5.2. Oxidation von Ethericin A

Ethericin A wurde in Äthanol gelöst (12 mg/2 ml), mit 0,5 ml H_2O_2 (30 %) versetzt und für 3 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Zersetzung des überschüssigen Wasserstoffperoxids wurde eine Spatelspitze Palladium-Kohlenstoff (10 %) zugegeben und nach 30 Minuten abfiltriert. Zum Vergleich des Oxidationsprodukts mit der nativen Substanz wurden biologische Aktivität, R_f-Werte, UV-Spektren und die Veränderung der Leitfähigkeit an schwarzen Lipidfilmen untersucht.

2.5.3. Spektren

2.5.3.1. UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit einem Varian-Techtron UV-Vis Spectrophotometer Modell 635 in Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) aufgenommen. Die verwendeten Lösungsmittel sind im Ergebnisteil (3.2.4.1.) angegeben.

2.6. Methoden zur biologischen Charakterisierung

2.6.1. Agardiffusions-Tests mit Bakterien und Pilzen

Für alle biologischen Tests (Ausnahme Streifengradienten-Test) wurden sterile Plastik-Petrischalen (Fa. Greiner, Nürtingen) mit 10 ml den Testkeim enthaltendem Nähragar gefüllt.

2.6.1.1. Rondellen-Test

Filterpapierscheiben (6 mm Durchmesser; Macherey, Nagel und Co., Düren) wurden mit 10 µl der zu testenden Antibioticalösung beschickt und nach dem Trocknen auf die Testplatte gelegt. Eine quantitative Auswertung der Hemmhöfe konnte nach der Formel von Kavanagh (1963) erfolgen.

2.6.1.2. Kreuztest

Die Durchführung eines Kreuztests ist bei Bonifas (1952), Juillard (1957) und Zähner (1965) beschrieben.

2.6.1.3. Streifengradienten-Test

Dieser zur Prüfung schlecht diffundierender Substanzen verwendbare Test (Zähner, 1965) wurde mit quadratischen Petrischalen (Kantenlänge 9 cm) durchgeführt. Beide Agarschichten (je 17,5 ml) enthielten *Bacillus subtilis*-Sporen, um Verfälschungen des Substanzgradienten durch einen Gradienten der Sporendichte zu vermeiden.

2.6.2. Verdünnungsreihen-Test

Der Test wurde zur Feststellung der minimalen Hemmkonzentration sowie zur Überprüfung der Ergebnisse des Rondellen-Tests verwendet. Die Durchführung ist bei Kavanagh (1963) und Zähner (1965) beschrieben.

2.6.3. Bioautographie

Kieselgel-Alufolien (E. Merck, Darmstadt) wurden nach der Entwicklung getrocknet, ca. 1 cm breite Streifen ausgeschnitten und auf Testplatten aufgelegt. Nach der Inkubation konnte der R_f-Wert anhand der Lage der Hemmhöfe ermittelt werden.

2.6.4. Versuche mit dem Biophotometer

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration in Abhängigkeit von Zellzahl und Wachstumsphase, sowie zur Untersuchung der Wirkung von Ethericin A in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration fand ein Biophotometer (Fa. Jouan, Paris, Frankreich) Verwendung. Das Gerät ist bei Poralla (1967) beschrieben. Die Küvetten wurden mit 7 ml Kultur (*Bacillus subtilis,* Medium MD, E_{578} = 0,1 bzw. 0,2) gefüllt. Im Biophotometer wurde die Transmission auf 80 % bzw. 63 % abgeglichen und bei 37° C mit maximaler Belüftung inkubiert. Die zu testenden Antibiotica wurden in maximal 10 µl Äthanol gelöst, der Kontrolle ebenfalls 10 µl Äthanol zugegeben.

2.7. Methoden zur Untersuchung der Wirkungsweise

2.7.1. Einbau von markiertem Isoleucin, Uracil, Thymidin und N-Acetylglucosamin

Zur Untersuchung der Protein-, RNA-, DNA- und Murein-Synthese wurde der Einbau von Biosynthese-Vorstufen in säurefällbares Material aus Bakterienzellen bestimmt (Siddhikol et al., 1969).

Eine exponentiell wachsende Kultur von *Bacillus subtilis* ATCC 6051 (Medium MD, E_{578} = 0,1) wurde in entsprechende Ansätze aufgeteilt und die radioaktiv markierten Vorstufen sowie die zu testenden Antibiotica zugesetzt.

Eingesetzt wurden:

[^{14}C]-Isoleucin: 11,4 nCi/ml (spez. Aktivität 10 mCi/mmol)
Isoleucin: 60 nmol/ml

[^{14}C]-Uracil: 21,4 nCi/ml (spez. Aktivität 61 mCi/mmol)
Uracil: 42,9 nmol/ml

[^{14}C]-Thymidin: 50 nCi/ml (spez. Aktivität 57 mCi/mmol)

[^{14}C]-N-Acetylglucosamin:
50 nCi/ml (spez. Aktivität 60 mCi/mmol)

Die Testansätze wurden bei 37° C auf einer rotierenden Schüttelmaschine (200 rpm, Kolben mit einer Einkerbung) inkubiert, zu den angegebenen Zeiten je Probe 200 µl entnommen und in 2 ml eiskalte Trichloressigsäure (5 %) pipettiert. Danach wurden die Proben durch Membranfilter (0,45 µm Porenweite, 25 mm Durchmesser, Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen) gesaugt und diese dreimal mit je 4 ml TCA gewaschen.

Nach dem Trocknen der Filter wurde in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (12,5 g PPO in 2,5 l Toluol) im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (Mark II, Nuclear Chikago, Des Plaines, Ill., USA) gemessen. Die Zählausbeute betrug 39 %.

2.7.2. Makromolekülsynthesen in vitro

2.7.2.1. Zellfreie Proteinsynthese

Der Einfluß der Antibiotica Ethericin A und B auf die Poly-U abhängige Poly-Phe-Synthese im zellfreien System von *Escherichia coli* sollte geprüft werden. Der Versuch wurde nach der Vorschrift von Traub und Nomura (1968) und Wolf (1971) durchgeführt.

Puffer: 13 mM $MgCl_2$, 60 mM Tris-HCl (pH 7,8), 30 mM KCl, 30 mM NH_4Cl, 2 mM Dithiothreitol

Mix A: 50 µl Puffer, 10 µl Polyuridylsäure (4 mg/ml) 10 µl Ribosomen (A-260-Einheit: 800), 180 µl H_2O 5 Minuten bei 30° C vorinkubiert.

Mix B: 50 µl Puffer, 4 µl ATP (50 mM, neutralisiert), 4 µl GTP (50 mM), 10 µl PEP (50 mM), 2 µl Pyruvat-Kinase 20 µl S-100, 10 µl [^{14}C]-Phenylalanin (5 µCi/µl, spez. Aktivität 486 Ci/mol) Vorinkubation 5 Minuten bei 30° C.

30 µl Mix A wurden 5 Minuten bei 30° C mit 1 µl Ethericin A und B (in Äthanol, Konzentrationen siehe 3.4.2.1.) vorinkubiert, auf 0° C abgekühlt und dann die Reaktion mit 30 µl Mix B gestartet. Inkubiert wurde bei 30° C. Nach 5, 10 und 20 Minuten wurden je 15 µl entnommen und auf Glasfaser-Filter (Whatman 3 MM-Filter, Durchmesser 25 mm, W. and R. Balston Ltd., Maidstone, GB) pipettiert.
Durch Überführen der Filter in Trichloressigsäure (5 %) wurde die Reaktion gestoppt. Danach wurde nach dem folgenden Schema gewaschen:

5	min	0° C	TCA (5 %)
10	min	90° C	" (Hydrolyse)
3 x 3	min	25° C	"
3	min	25° C	Äther/Äthanol = 1/1 (v/v)
3	min	25° C	Äther

Die getrockneten Filter wurden im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (LSC) wie beschrieben (2.7.1.) gemessen.

2.7.2.2. DNA-Synthese in Toluol-behandelten Zellen von *Bacillus subtilis*

Der Testansatz (Nüsslein und Klein, 1975) enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml:

10	µl	2	M	Tris-HCl-Puffer pH 7,8	(20 µmol)
2,5	µl	2	M	$MgCl_2$	(5 µmol)
1	µl	0,1	M	EDTA	(0,1 µmol)
50	µl	2	M	KCl	(100 µmol)
20	µl	50	mM	ATP	(1 µmol)
10	µl	2	mM	dATP	(0,02 µmol)
10	µl	2	mM	dTTP	(0,02 µmol)
10	µl	2	mM	dCTP	(0,02 µmol)
10	µl	2	mM	dGTP	(0,02 µmol)
10	µl	20	mM	NAD	(0,2 µmol)
865	µl			H_2O bidest.	
10	µl			[^{3}H]-dTTP (30 Ci/mmol; 1 µCi/µl)	

Exponentiell wachsende Zellen von *Bacillus subtilis* Tü 203 wurden abzentrifugiert (E_{578} = 0,15), mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4; 0,05 M) gewaschen und in demselben Puffer resuspendiert. Nach der Behandlung mit Toluol auf der rotierenden Schüttelmaschine (1 % v/v, 27° C, 10 min, 220 rpm) wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 4° C aufbewahrt, danach zentrifugiert und 10^9 Zellen/ml in Kaliumphosphat-Puffer aufgenommen.

Jeweils 100 µl des obigen Testansatzes wurden mit 20 µl Zellsuspension vereinigt und die Antibiotica in fester Form zugegeben. Nach dem Start der Reaktion wurden bei einer Inkubationstemperatur von 37° C nach 10, 20, 30 und 40 Minuten je 20 µl entnommen und in eiskalte Trichloressigsäure-0,1 M pp_i pipettiert. Diese Probe wurde durch ein Membranfilter (0,45 µm

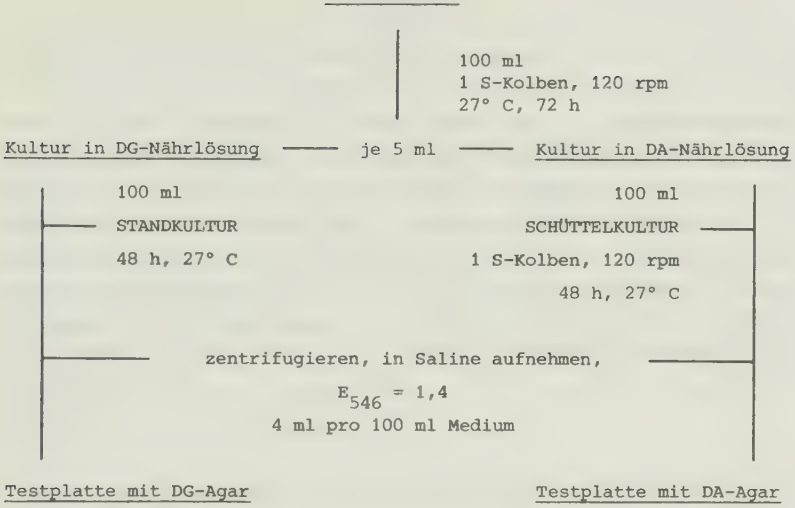
Porenweite, Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen) gesaugt, das zweimal mit 3 ml 0,01 M HCl gewaschen wurde.
Die Filter wurden getrocknet (45 min; 80° C) mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (12,5 g PPO in 2,5 l Toluol) versetzt und im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer gemessen.

2.7.2.3. RNA-Synthese in vitro

Bei diesem Versuch wurde der Einbau von radioaktiv markiertem ATP in säurefällbare RNA gemessen. Der Testansatz (Zillig et al., 1966) von 250 µl enthielt:
0,05 mg/ml DNA (Kalbsthymus); 1 mM CTP, GTP, UTP und [^{14}C]-ATP (0,25 µCi, spez. Aktivität 558 mCi/mmol); 0,03 M Trisacetat-Puffer pH 7,9; 0,03 M Magnesiumacetat; 0,13 M Ammoniumchlorid; 40 µg/ml DNA-abhängige RNA-Polymerase.
Die zu testenden Antibiotica wurden in 10 µl Äthanol gelöst und als Kontrolle die entsprechende Menge Äthanol eingesetzt. Das im Eisbad vorbereitete Reaktionsgemisch wurde bei 37° C inkubiert und die Reaktion nach 10 Minuten durch 2,5 ml Eiswasser gestoppt. Nachdem 2,5 ml Trichloressigsäure (10 %) zugesetzt worden waren, wurde über Membranfilter abgesaugt und die Radioaktivität auf die beschriebene Weise (2.7.1.) bestimmt.

2.7.3. Differenztest mit *Pichia farinosa*

Als Testorganismus wurde die echte Hefe *Pichia farinosa* Tü 291 verwendet. Die Versuchsdurchführung ist im folgenden Testschema dargestellt (DA und DG siehe 2.2.).



2.7.4. Methoden zur Untersuchung von Membranwirkungen in vivo

2.7.4.1. Isolierung der Lipide aus *Bacillus subtilis*

Die Aufarbeitung erfolgte nach der Methode von Bligh und Dyer, modifiziert nach Kates (1972).
Zu 50 mg Zellen wurden 1 ml Wasser und 3,75 ml Methanol/Chloroform = 2/1 (v/v) zugesetzt. Die Suspension wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen, dann zentrifugiert und dekantiert. Der Rückstand wurde mit 4,75 ml Methanol/Chloroform/Wasser = 2/1/0,8 (v/v) versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Zu den beiden vereinigten Überständen wurden je 2,5 ml Wasser und Chloroform zugegeben. Nach der Zentrifugation wurde die Chloroformphase mit 2 M KCl und Wasser gewaschen und im Rotationsverdampfer eingeengt. Der trockene Rückstand wurde in Chloroform/Methanol = 2/1 (v/v) aufgenommen (1 mg/ml) und für Antagonisierungsversuche verwendet.

2.7.4.2. Test auf grobe Membranschädigung

Bacillus subtilis Tü 203 wurde in Medium MD bei 37° C gezüchtet und bei E_{578} = 0,1 durch Zentrifugation geerntet. Danach wurden die Zellen dreimal mit 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 gewaschen und in Puffer bzw. Medium MD (mit Glucose) aufgenommen (E_{578} = 0,1). Zu dieser Zellsuspension wurden die im Ergebnisteil (3.4.4.2.) angegebenen Antibioticamengen zugesetzt und nach 10, 20, 30 und 60 Minuten je eine Probe genommen, die sofort zentrifugiert wurde. Im Spektralphotometer (PMQ 3, Carl Zeiss, Oberkochen) wurde bei 260 und 280 nm der Austritt von absorbierendem Material gemessen. Als positive Kontrolle diente Lipomycin (Kunze, 1975).

2.7.5. Methoden zur Untersuchung von Membranwirkungen, Vesikelversuche

2.7.5.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der leicht veränderten Standardmethode von Lowry et al. (1951).

2.7.5.2. Herstellung von Membranvesikeln aus *Bacillus subtilis*

Membranvesikel aus *Bacillus subtilis* ATCC 6051 wurden, nach der Methode von Konnings et al. (1973) modifiziert, hergestellt. Eine exponentiell wachsende Kultur (Medium MD, E_{578} = 0,1) wurde durch Zentrifugation (14000 g; 20 min) geerntet, darauf die Zellen mit Phosphatpuffer pH 7,2 (0,1 M) gewaschen und wiederum zentrifugiert.
Zu den in 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0 mit 20 % Sucrose suspendierten Zellen wurden 300 µg/ml Lysozym zugegeben und der Ansatz 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Darauf wurde wieder ab-

zentrifugiert (14000 g; 30 min).
Die Zellen wurden in 0,05 M Phosphatpuffer pH 8,0 aufgenommen (4 g/l) und nacheinander zugegeben:

Lysozym 300 µg/ml; DNase 10 µg/ml; RNase 10 µg/ml.

Nach 15 Minuten bei 37° C wurde $MgSO_4$ bis zu einer Endkonzentration von 10 mM und nach weiteren 30 Minuten EDTA (Endkonzentration 15 mM) zugesetzt. 15 Minuten danach wurde die $MgSO_4$-Konzentration auf 20 mM erhöht und die Inkubation 15 Minuten später durch Zentrifugation (20000 g/30 min) gestoppt. Nach einer differentiellen Zentrifugation (121 g/20 min und 30000 g/15 min) wurde nur der hyaline Rand des Zentrifugats in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,6 aufgenommen. Die Vesikelpräparationen wurden in Portionen von 1 ml (1,5 mg Protein) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.7.5.3. Bestimmung der ATPase-Aktivität

Die spezifische Aktivität der Adenosin-Triphosphatase aus Membranpräparationen von *Bacillus subtilis* ATCC 6051 wurde mit dem Test von Hanson und Kennedy (1973) bestimmt.

Testschema: $ATP \longrightarrow ADP + P_i$

$$\text{Phosphoenolpyruvat} + ADP \rightleftharpoons ATP + \text{Pyruvat}$$

$$\text{Pyruvat} + NADH + H^+ \rightleftharpoons \text{Lactat} + NAD^+$$

Die Abnahme der Absorption bei 366 nm wurde im Photometer bei 30° C bestimmt. Die Hydrolyse von 1 mol ATP entsprach der Oxidation von 1 mol NAD.
Der Testansatz enthielt in 3 ml:
Tris-Sulfat 40 mM pH 7,8; KCl 0,1 M; $MgSO_4$ 10 mM; ATP (neutralisiert) 10 mM; Phosphoenolpyruvat 2 mM; NADH 0,3 mM; Pyruvat-Kinase 30 µg; Lactat-Dehydrogenase 30 µg; Vesikelprotein 150 µg.

Zur Feststellung der Zeitabhängigkeit wurden Vesikel und Antibiotica in Tris-Sulfat und KCl mit oder ohne $MgSO_4$ vorinkubiert. Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgte nach Bergmeyer und Mitarbeitern (1970).

2.7.5.4. Transport von [^{3}H]-Prolin in Membranvesikeln

Die Transportversuche wurden nach der bei Harold (1972) sowie Konnings und Freese (1972) beschriebenen Methode durchgeführt.

Suspension (1): Membranvesikel 0,2 ml; ention. Wasser 0,9 ml; $MgSO_4$ (0,1 M) 0,2 ml; Kaliumphosphatpuffer (1 M; pH 6,6) 0,1 ml.

Suspension (2): gemischt in einem kleinen Reagenzglas Suspension (1) 0,07 ml; ention. Wasser 0,01 ml; [^{3}H]-Prolin (0,1 mM; 0,1 µCi/Probe) 0,01 ml.

Proteinmengen : *Bacillus subtilis* 1,5 mg/ml Vesikelsuspension
Escherichia coli 2 mg/ml Vesikelsuspension.

Nach 3 Minuten Vorinkubation bei 25° C wurde die Reaktion mit 10 µl Li-Lactat (0,2 M) gestartet; dem Leerwert wurde die entsprechende Menge Wasser zugesetzt. Die beiden Antibiotica Ethericin A und B wurden beim Start der Reaktion zugegeben.

Zu den angegebenen Zeiten (3.4.5.2.) wurde die Reaktion mit 2 x 2 ml LiCl (0,1 M) gestoppt und die Suspension über Membranfilter (0,45 µm Porenweite, Schleicher und Schüll, Dassel) abfiltriert. Zu den getrockneten Membranfiltern wurden 10 ml Szintillationsflüssigkeit (12,5 g PPO und 0,75 g POPOP in 2,5 l Toluol) gegeben und im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer gemessen.

2.7.6. Versuche zur Wechselwirkung mit Ionen

2.7.6.1. Pikrat-Test

Bei diesem Test (Suzuki et al., 1971) werden die monovalenten Kationen durch die Komplexbildung mit dem zu testenden Antibioticum lipidlöslich gemacht und können dadurch in die organische Phase extrahiert werden.

Testlösung: 400 mg Natrium-Pikrat gelöst in destilliertem Wasser, nach Zugabe von 4 g NaOH auf 1 l Gesamtvolumen aufgefüllt.

Die zu prüfenden Antibiotica wurden in 10 ml Dichlormethan gelöst und mit 5 ml obiger Testlösung etwa 1 Minute lang geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde die untere organische Phase mit wasserfreiem $NaSO_4$ entwässert und die optische Dichte bei 377 µm bestimmt.

2.7.6.2. Versuche an schwarzen Lipidfilmen[1)]

Die Versuche an künstlichen Lipidfilmen folgten der bei Läuger (1972) beschriebenen Methode. Als membranbildendes Material wurde L-α-Phosphatidylcholin in n-Decan verwendet. Die Messungen erfolgten, nachdem der Widerstand der dann bimolekularen Lipidmembranen sich nicht mehr veränderte. Ähnlich sehr dünnen Seifenfilmen reflektieren solche Membranen Licht nur äußerst schwach, sie werden deshalb als "schwarze Filme" bezeichnet.

Der Übergang einer farbigen (mehrschichtigen) zu einer schwarzen (zweischichtigen) Membran konnte durch fotografische Aufnahmen gezeigt werden (Nöll, 1976).

2.7.6.3. Extraktionsversuche im zweiphasigen System

Die Extraktionsversuche im zweiphasigen System wurden in Anlehnung an die bei Pfeiffer und Lardy (1976) beschriebene Methode durchgeführt.

---

1) Herrn Dr. R. Kanne danke ich für seine Hilfe.

Die wäßrige Unterphase (1 ml; Tris-HCl pH 6 oder 7; 50 mM) wurde mit 2 ml organischer Oberphase (Toluol/Butanol = 70/30; Ethericin A 0,1 mM; im Leerwert entsprechende Menge Äthanol) bei 37° C geschüttelt. Die Inkubationsdauer betrug 1 Stunde, unterbrochen von 2 x 1 min intensiver Mischung.

Eingesetzte Ionen:

$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	5 mM	$^{45}Ca^{2+}$	0,1 µCi/ml
$FeCl_3$	5 mM	$^{55}Fe^{3+}$	1,15 µCi/ml

Nach der Inkubation wurde zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (3000 rpm, 15 min) und aus der Oberphase 1 ml entnommen, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer gemessen.

2.8. Stimulationsversuche an Mäusemilzzellen

Mit Hilfe der bei Bessler und Mitarbeitern (1977a) beschriebenen Methode wurde der Einbau von [^{3}H]-Thymidin in Mäusemilzzellen verfolgt.

Mäusestämme: C57Bl/6J und C3H/HeJ

Die Antibiotica Ethericin A und B wurden in DMSO gelöst und in den im Ergebnisteil (3.5.) angegebenen Konzentrationen den Zellkulturen zugesetzt.

Zur Untersuchung des Einflusses von Ethericin A auf die durch Concanavalin A hervorgerufene Stimulation wurden beide Substanzen gleichzeitig zugegeben.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Herstellung der Antibiotica

3.1.1. Fermentation

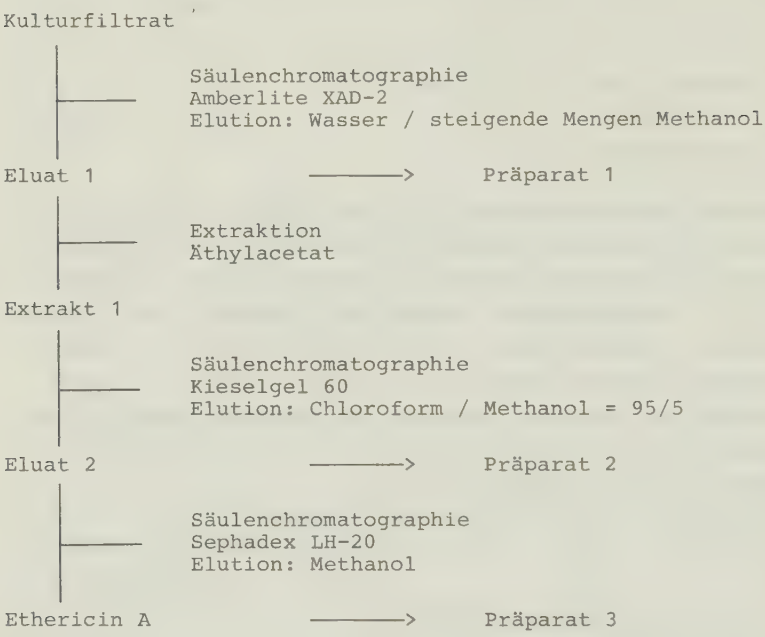
Größere Substanzmengen wurden in Fermentern mit 10, 20 und 100 Litern Nutzvolumen hergestellt. Die Bedingungen sind unter 2.4.1. beschrieben, der Verlauf einer typischen Fermentation (10 l, konventionelles Rührsystem) ist bei Schanz (1975) dargestellt. Ähnliche Werte werden im 100 l-Fermenter erhalten. Dagegen steigerte sich bei 20 l-Fermentationen mit Umwurf-System zwar das Mycelwachstum auf etwa das Doppelte, aber die Ausbeute an Ethericin A und B betrug nur ca. 50 % einer typischen 10 l-Fermentation.

3.1.2. Isolierung der Antibiotica

Unter den beschriebenen Bedingungen (2.4.1.) sind biologische Aktivität und Wasserstoffionenkonzentration in der wachsenden Kultur so miteinander verbunden, daß statt der Aktivität auch der pH-Wert als Kriterium für den Erntezeitpunkt dienen konnte. Nach Erreichen von pH 2,6 wurde die Kultur über eine Filterpresse in Mycel und Filtrat getrennt und das braun-violette Mycel verworfen, da in ihm keine Aktivität nachweisbar war. Das Kulturfiltrat wurde nach 2.4.2. aufgearbeitet, das folgende Schema (3.1.2.1.) faßt diese Aufarbeitung kurz zusammen.

Mit den erzielten Ausbeuten konnte der Bedarf an Substanz für die laufenden Arbeiten gedeckt werden und Versuche zur Optimalisierung, anknüpfend an die bei Schanz (1975) beschriebenen, sind deshalb unterblieben.

3.1.2.1. Schema der Aufarbeitung



3.1.2.2. Quantitative Auswertung einer Aufarbeitung im 10 l-Maßstab

Tabelle 1 zeigt die quantitative Auswertung einer Aufarbeitung.

Die Mengenangaben sind Mittelwerte aus fünf 10 l-Fermentationen. Als Grundlage zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten dienten die ausgewogenen Präparatmengen und die Anreicherungen, ermittelt aus der mit Hilfe des Plattendiffusions-Tests erstellten Abbildung 1.

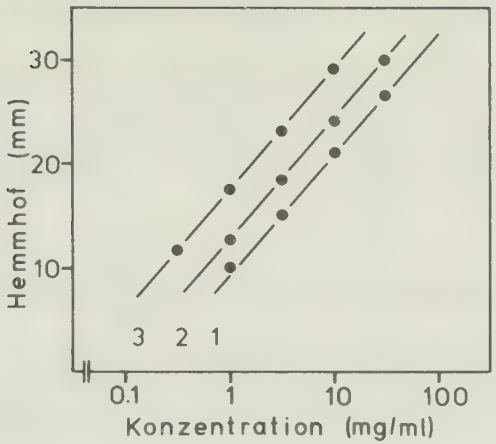


Abb. 1: Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers (*Bacillus subtilis*, Medium TA) von der Konzentration des Antibioticums Ethericin A.

1, 2 = angereicherte Präparate; 3 = Ethericin A

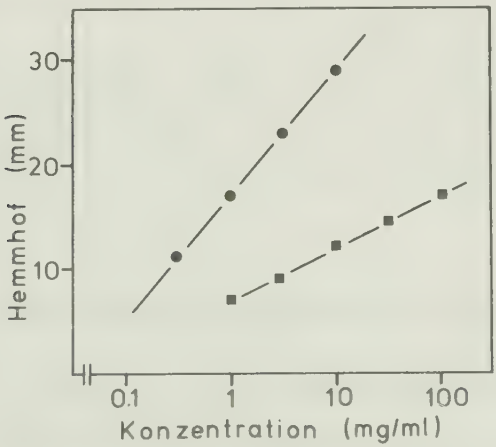


Abb. 2: Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers (*Bacillus subtilis*, Medium TA) von der Konzentration der Antibiotica Ethericin A und B.

- ● - Ethericin A - ■ - Ethericin B

Tab. 1: Quantitative Auswertung der Fermentation im 10 l-Maßstab (Mittelwerte aus 5 Fermentern)

Präparat	Aufarbeitungsschritt	Gesamtgewicht (g)	spezifische Aktivität	Gesamtaktivität	Anreicherung	Ausbeute (%)
1	XAD-2	5,1	21,3	109	1	100
2	Kieselgel	2,4	38,4	92	2,6	84
3	LH-20	0,89	100	89	4,7	82

Die Bilanz gilt für die Hauptkomponente Ethericin A und erfaßt Ethericin B nicht. Aus Abbildung 2 geht hervor, daß der gemessene Hemmhof (äußerer Rand) bei gleichen Konzentrationen beider Antibiotica durch Ethericin A bestimmt wird.
Die Voraussetzung dieser Aussage, daß Ethericin A und B sich nicht gegenseitig beeinflussen, wurde im Kreuztest (Medium TA, *Bacillus subtilis*, je 10 mg/ml Ethericin A und B) geprüft. Gegenseitige Beeinflussung konnte nicht festgestellt werden.
Die Ausbeute an Ethericin B, verglichen mit Ethericin A (89 mg/l), ist gering und liegt in der Größenordnung von 3 mg/l Kultur.

3.2. Physikalische und chemische Charakterisierung

3.2.1. Löslichkeit und Stabilität

Die beiden Antibiotica Ethericin A und B sind farblos. Ethericin B kristallisiert in langen Nadeln.
Beide Substanzen sind schwer löslich in Wasser, Tetrachlorkohlenstoff und Petroläther, gut löslich in Äthanol, Methanol, Äthylacetat, Chloroform und Dimethylsulfoxid.

Ethericin B ist stabiler als Ethericin A, das leicht unter Bildung eines gelben Farbstoffes inaktiviert wird. Zwölf Stunden bei 37° C genügen zur Inaktivierung (Restaktivität 3 %).
Der unter anderem auch auf Dünnschichtchromatogrammen entstehende gelbe Farbstoff (Benzol/Methanol/Eisessig = 4/1/1; R_f-Wert 0,6) konnte auch im Oxidationsversuch (3.2.3.) nachgewiesen werden.

3.2.2. Dünnschichtchromatographie und Identifizierung

Die R_f-Werte von Ethericin A und B in verschiedenen Laufmittelsystemen sind in Tabelle 2 dargestellt. Chromatographiert wurde an Kieselgel (Alu-Folien oder Fertigplatten; Kieselgel 60; E. Merck, Darmstadt).

Tab. 2: R_f-Werte von Ethericin A und B mit verschiedenen Laufmittelsystemen

Laufmittelsysteme (v/v)	R_f-Werte Ethericin A	B
Benzol/Methanol/Eisessig = 4/1/1	0,49	0,61
Chloroform/Methanol = 97/3	0,11	0,54
Chloroform/Methanol = 1/1	0,68	0,79
Propanol/Wasser = 8/2	0,69	0,73
Toluol/Äthylacetat/Ameisensäure = 5/4/1	0,43	0,65

Auf den entwickelten Chromatogrammen sind die beiden Antibiotica identifizierbar durch:

1. Fluoreszenzlöschung im UV-Licht (254 nm)
2. Bioautographie (Zähner und Maas, 1972)
3. Molybdatophosphorsäure (Sprühreagenz; 3,5 %; E. Merck, Darmstadt): sofort erscheinender blauer Fleck mit Ethericin A
4. Liegenlassen an der Luft: Ethericin A = gelber Fleck; Ethericin B = bräunliche Verfärbung.

3.2.3. Oxidation von Ethericin A

Das Produkt der unter 2.5.2. beschriebenen Reaktion war stark gelb gefärbt. Das UV-Vis-Spektrum mit einem Gipfel bei 294 nm ist in Abbildung 3 dargestellt. Wegen der starken Verdünnung wurde der gelbe Farbstoff (Gipfel bei 380 nm) vom Spectrographen nicht aufgezeichnet.
Die aus Ethericin A erhaltenen Oxidationsprodukte zeigten keine biologische Aktivität gegen *Bacillus subtilis* (60 µg/ml) und keinen Einfluß auf die Leitfähigkeit an schwarzen Lipidfilmen aus Lecithin.
Im Dünnschichtchromatogramm konnten durch Fluoreszenzlöschung 4 Flecke festgestellt werden. Die R_f-Werte in Benzol/Methanol/Eisessig = 4/1/1 betrugen 0,22; 0,45; 0,53 und 0,6 (Ethericin A 0,49).

3.2.4. Spektren

3.2.4.1. UV-Vis-Spektren

Die UV-Vis-Spektren von Ethericin A und B, aufgenommen in Äthanol und 0,1 N NaOH (äthanolische Lösung) sind in Abbildung 3 und 4 dargestellt. In 0,1 N HCl (äthanolische Lösung) aufgenommene Spektren waren identisch mit solchen in Äthanol.
Zum Vergleich können folgende Spektren herangezogen werden:

2,3'-Dicarboxy-4,5,6,5',6'-pentahydroxydiphenylether
Dehydro-digallussäure (Mayer, 1952)
Gipfel bei: 220 und 260 nm (Dioxan)

2,3'-Dihydroxy-4-methoxy-6,5'-dimethyldiphenylether
LL-V 125 α (McGahren et al., 1970; Cannon et al., 1971)
Gipfel bei: 225, 275 und 282 nm (Methanol)
235 und 290 nm (methanolische NaOH)

Pentamethylether-dehydro-digallussäure-dimethylester (Mayer, 1952)
Gipfel bei: 225, 260 und 300 nm (Dioxan).

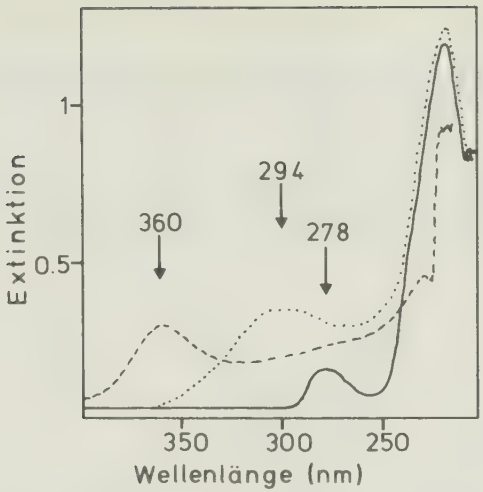


Abb. 3: UV-Vis-Absorptionsspektrum von Ethericin A (10 µg/ml)
—— in Äthanol; --- 0,1 N NaOH (äthanolische Lsg.)
.... Oxidationsprodukt in Äthanol

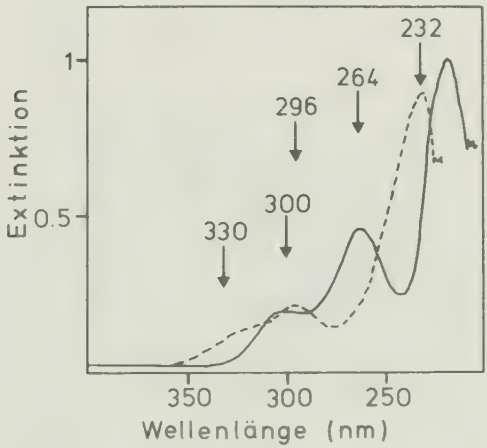


Abb. 4: UV-Vis-Absorptionsspektrum von Ethericin B (10 µg/ml)
—— in Äthanol; --- 0,1 N NaOH (äthanolische Lsg.)

3.2.4.2. IR-Spektren

Die Infrarot-Spektren von Ethericin A und B sind in Abbildung 5 und 6 wiedergegeben.

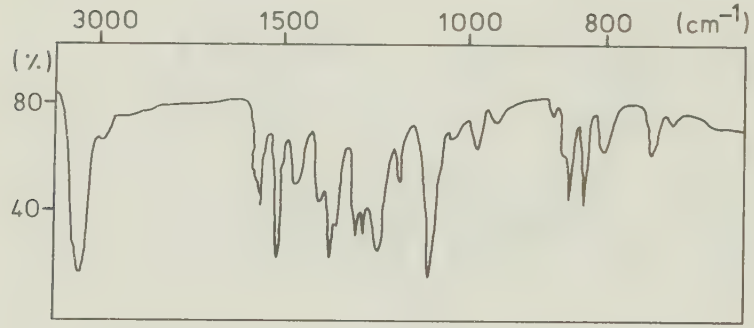


Abb. 5: IR-Absorptionsspektrum von Ethericin A in KBr.

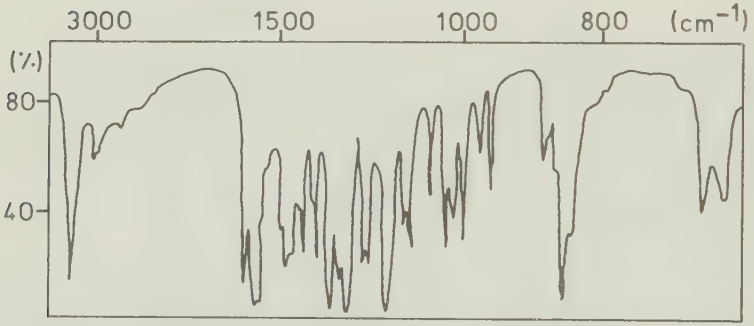
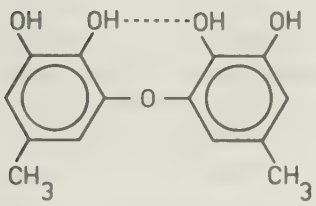


Abb. 6: IR-Absorptionsspektrum von Ethericin B in KBr.

3.2.5. Struktur von Ethericin A und B

Durch Interpretation von Massen- und NMR-Spektren, ergänzt durch chemische Untersuchungen, konnte Herr Professor Dr. W.A. König (Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Hamburg) die Struktur von Ethericin A (Abb. 7) ermitteln und außerdem Strukturvorschläge für Ethericin B (Abb. 8) und ein Isomeres von Ethericin A formulieren.

3.2.5.1. Ethericin A



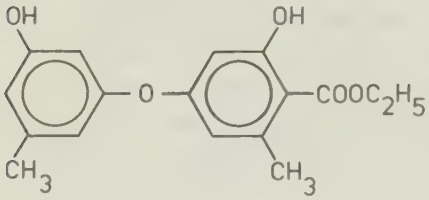
Molekulargewicht: 262
Summenformel: $C_{14}H_{14}O_5$

2,2',3,3'-Tetrahydroxy-
5,5'-dimethyldiphenylether

Abb. 7: Strukturformel von Ethericin A

Wie auch unter 3.2.3. gezeigt wurde, läßt sich Ethericin A oxidieren, das Produkt ist ein o-Chinon. Eine Totalsynthese bestätigt die obige Strukturformel.
Kurz vor Abschluß dieser Dissertation konnte im Labor von Professor König eine isomere Nebenkomponente (10 %) der vermutlichen Struktur 2,2',3',4-Tetrahydroxy-6,5'-dimethyldiphenylether isoliert werden.

3.2.5.2. Ethericin B



Molekulargewicht: 302
Summenformel: $C_{17}H_{18}O_5$

Abb. 8: Strukturformel von Ethericin B

Bei Ethericin B handelt es sich um einen aromatischen Äthylester. Zwei sehr unterschiedliche Hydroxylgruppen, 2 aromatische Methylgruppen und 5 aromatische Wasserstoffatome konnten im NMR-Spektrum wahrscheinlich gemacht werden. Dies wurde durch neuere Untersuchungen bestätigt; Ethericin B kommt danach wahrscheinlich die Struktur eines 4'-Carboethoxy-3,3'-dihydroxy-5,5'-dimethyldiphenylethers zu (Abb. 8).

3.3. Biologische Charakterisierung

3.3.1. Wirkungsspektrum

Von den in der Tabelle 3 aufgeführten Organismen wurde *Bacillus subtilis, Streptomyces viridochromogenes, Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* auch im Verdünnungsreihentest (2.6.2.) geprüft. Die ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen stimmten mit den im Plattendiffusionstest erhaltenen Werten in dem Sinne überein, daß deutliche, wenn auch bisweilen nur als Spuren erkennbare Hemmzonen (Agardiffusions-Test) der MIC entsprachen. In der Tabelle 3 sind diese Werte angegeben (vgl. Fußnote 1).

Tab. 3: Minimale Hemmkonzentrationen der Antibiotica Ethericin A und B im Plattendiffusionstest

Organismen	Inkubationstemperatur (°C)	Medium	MIC (µg/ml)[1] Ethericin A	Ethericin B
BAKTERIEN				
EUBACTERIALES				
Gram-negative B.				
Achromobacter geminiani	27	NA	100	< 10
Escherichia coli K12	37	NB	< 10	100
Escherichia coli K12-D22	37	NB	> 10	> 100
Escherichia coli K12-A19-15	37	NB	10	5
Proteus vulgaris	37	NB	1	1
Gram-positive B.				
Bacillus brevis	37	NA	1	1
Bacillus subtilis ATCC 6051	37	TA	< 1	5
Bacillus subtilis Tü 203	37	TA	< 1	< 10
Clostridium pasteurianum	30	AC	10	1
Sarcina lutea	37	MM	< 10	< 10
Staphylococcus aureus	37	NA	< 10	< 10
Staphylococcus aureus ATCC 11632	37	NA	< 10	< 10
PSEUDOMONADALES				
Pseudomonas fluorescens	27	HA	100	> 100
Pseudomonas saccharophila	37	NA	1	100
ACTINOMYCETALES				
Streptomyces antibioticus	37	nHA	10	< 10
Streptomyces viridochromogenes	37	nHA	5	5
S. viridochromogenes + EDTA[2]	37	nHA	5	5

Organismen			MIC (µg/ml) [1] Ethericin A	Ethericin B
PILZE				
ZYGOMYCETES				
Absidia corymbifera	37	HA	100	10
Mucor miehei	37	MA	> 100	< 10
ASCOMYCETES und DEUTEROMYCETES				
Hefeartige A. und D.				
Candida albicans	27	HA	> 100	> 100
Nadsonia fulvescens	27	HA	10	1
Pichia farinosa	27	HA	50	50
Saccharomyces cerevisiae	27	MA	> 100	> 100
Schizosaccharomyces pombe	27	HA	> 100	< 10
Andere A. und D.				
Aspergillus fumigatus	37	HA	> 100	> 100
Botrytis cinerea [3]	27	HA	100	10
Curvularia spec.	27	HA	10	1
Microsporum gypseum	27	HA	< 50	< 10
Paecilomyces variotii	37	MA	> 100	10

1) Konzentrationen: 100, 50, 10, 1 und 0,1 µg/Testrondelle (entspr. 100, 50, 10, 1 und 0,1 µg/ml im Verdünnungsreihen-Test)

2) EDTA im Agar (Endkonzentration 1 mM)

3) Test an der Riesenkolonie (Loeffler, 1970)

Beim Test an der Riesenkolonie mit *Botrytis cinerea* konnten im Einwirkungsbereich von Ethericin A schwache, bei Ethericin B starke, abnormale Verzweigungen ("Hexenbesen") festgestellt werden. Solche durch Antibiotica hervorgerufene Anomalien wurden be-

reits mehrfach beschrieben (Hütter et al., 1965; Kneifel et al., 1977).
Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die Antibiotica Ethericin A und B sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien wirken. Insgesamt scheinen Gram-positive Keime etwas empfindlicher zu sein. Während zur Hemmung von Pilzen mindestens 10 µg/ml Ethericin A benötigt werden, kann Ethericin B einzelne Pilze bereits in Konzentrationen von 1 µg/ml am Wachstum hindern.
Das Spektrum beider Antibiotica läßt keine besonders sensitive Organismengruppe erkennen, es erscheint sehr inhomogen und lückenhaft. Eine zusätzliche Komplikation bei der Interpretation der Ergebnisse mit Ethericin A ergibt sich aus dem Einfluß des Inoculums auf die Testresultate (3.3.2.1.).

3.3.2. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen von Ethericin A und B im Biophotometer

3.3.2.1. Ethericin A

Aus Abbildung 9 ist eine starke Abhängigkeit der Hemmwirkung von der Zellzahl des Testorganismus zu erkennen.
Während eine Antibioticum-Konzentration von 30 µg/ml bei einer Transmission von 80 % (E_{578} = 0,1) eine nahezu totale Hemmung hervorrief, konnte mit der gleichen Substanzmenge bei 63 % Transmission (E_{578} = 0,2) nur eine sehr schwache Hemmwirkung erzielt werden.
Weitere, in Abbildung 9 nicht dargestellte Versuche zeigten, daß das Ausmaß der Hemmung bei Verwendung von Sporen als Impfgut und gleichzeitiger Zugabe des Antibioticums sehr gut mit der im Verdünnungsreihentest ermittelten Wirkung in Einklang steht. Mit weniger als 10 µg/ml konnte die Sporenkeimung über einen Zeitraum von 10 Stunden verhindert werden. Zellen in der stationären Phase wurden durch Ethericin A bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml nicht beeinflußt.

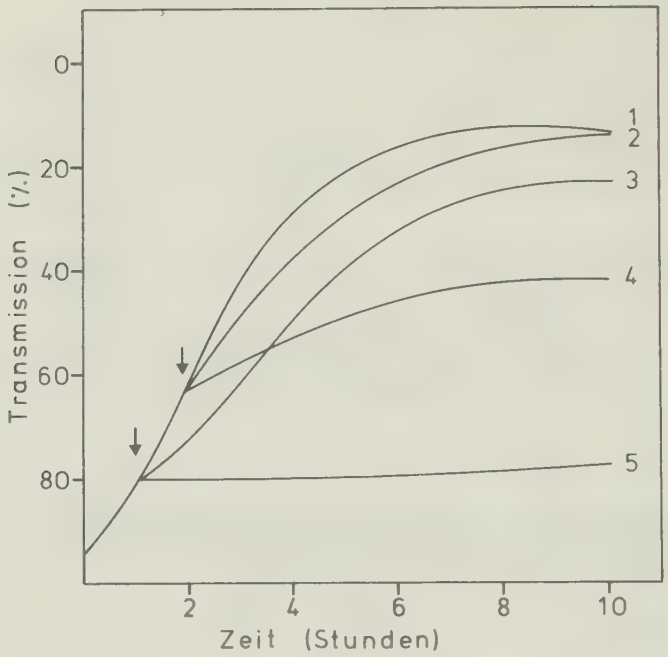


Abb. 9: Wirkung von Ethericin A auf das Wachstum von *Bacillus subtilis* (Medium MD, Zugabe des Antibioticums durch Pfeil gekennzeichnet).

1 Kontrolle
2 30 µg/ml Ethericin A
3 20 µg/ml Ethericin A
4 40 µg/ml Ethericin A
5 30 µg/ml Ethericin A

3.3.2.2. Ethericin B

Die für Ethericin B ermittelte minimale Hemmkonzentration bei einer Transmission von 80 % (E_{578} = 0,1) liegt im Bereich der im Verdünnungsreihentest ermittelten Werte (5 µg/ml; Abb. 10). Aus begleitenden orientierenden Versuchen ging hervor, daß die

MIC von der Einsaatdichte der Testkeime nicht so stark abhängt wie bei der Wirkung des Ethericin A. Auch durch Ethericin B wurden Zellen in der stationären Phase nicht beeinflußt (bis 100 µg/ml).

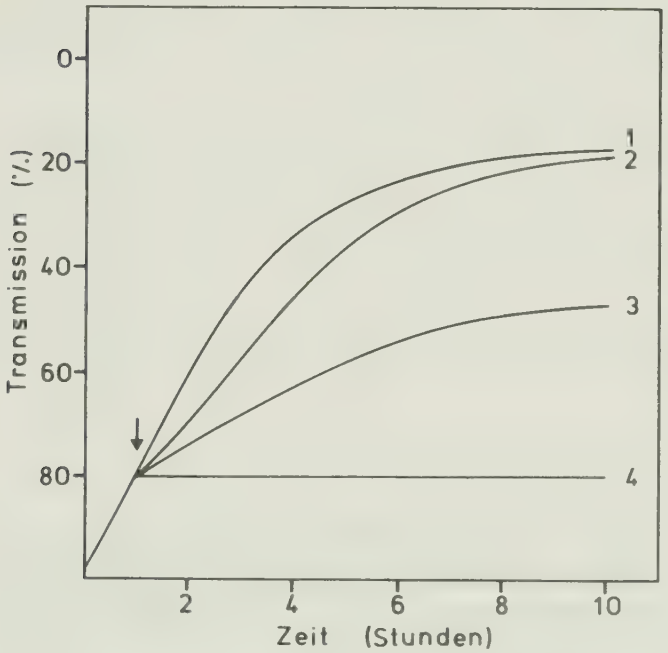


Abb. 10: Wirkung von Ethericin B auf das Wachstum von *Bacillus subtilis* (Medium MD, Zugabe des Antibioticums durch Pfeil markiert).

1 Kontrolle
2 7 µg/ml Ethericin B
3 10 µg/ml Ethericin B
4 14 µg/ml Ethericin B

3.4. Untersuchungen zur Wirkungsweise der Antibiotica

3.4.1. Einfluß von Ethericin A und B auf die Makromolekülsynthesen in vivo

Bei Untersuchungen zur Wirkungsweise von Antibiotica konnte sehr oft der primäre Wirkort im Bereich der 4 Makromolekülsynthesen gefunden werden (Takeshima et al., 1976; Ward, 1977; Wilhelm et al., 1968; Wolf et al., 1977).
Der Einfluß der Antibiotica Ethericin A und B auf die Makromolekülsynthesen ist in Abbildung 11 bis 14 wiedergegeben.
Zum Vergleich wurden Antibiotica mit bekanntem Wirkort verwendet, deren Angriffsort in der jeweiligen Synthese von Makromolekülen liegt (Franklin und Snow, 1975; Hartmann et al., 1968).

Einige bei der Interpretation von Einbau-Versuchen in vivo zu beachtende Faktoren sind bei Wolf (1971) diskutiert.

3.4.1.1. Wirkung von Ethericin A

Mit einer Ethericin A-Konzentration von 19 µg/ml Testansatz konnte bei Murein-, Protein- und DNA-Synthese nur eine schwache Hemmung erreicht werden. Lediglich der Einbau von markiertem Uracil in säurefällbares Material wurde stärker beeinflußt. 35 µg/ml hemmten DNA- und RNA-Synthese vollständig, die Proteinsynthese nur wenig schwächer, die Mureinbiosynthese zu 67 %.

3.4.1.2. Wirkung von Ethericin B

Alle 4 Makromolekülsynthesen wurden durch Ethericin B (15 µg/ml) nahezu vollständig gehemmt. Bei der Proteinsynthese genügten 7,5 µg/ml für eine 2 Stunden anhaltende Totalhemmung. Die Einbaurate von Uracil in die RNA stieg mit derselben Konzentration nach 60 Minuten wieder an und erreichte nach 2 Stunden ca. 40 % der Kontrolle ohne Antibioticum.

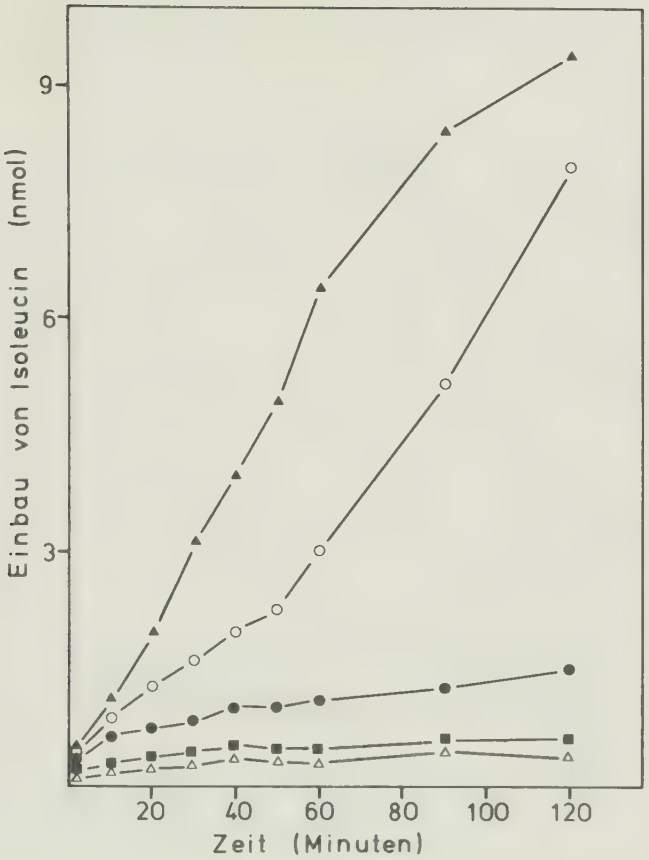


Abb. 11: Wirkung von Ethericin A und B auf die Protein-Synthese in vivo (*Bacillus subtilis*, Medium MD).

- ▲ - Kontrolle
- △ - Chloramphenicol (20 µg/ml)
- ● - Ethericin A (35 µg/ml)
- ○ - Ethericin A (19 µg/ml)
- ■ - Ethericin B (7,5 µg/ml)

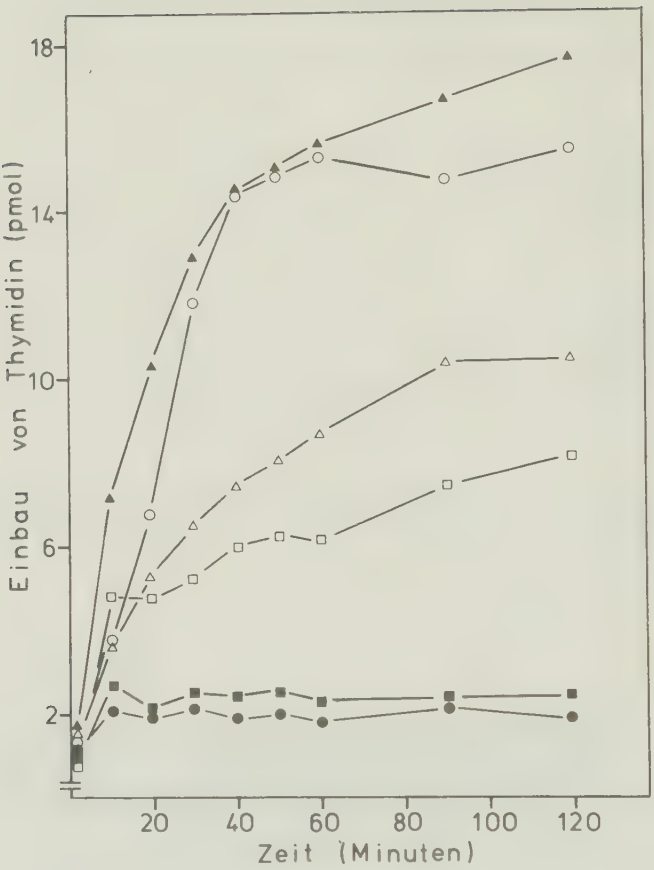


Abb. 12: Wirkung von Ethericin A und B auf die DNA-Synthese in vivo (*Bacillus subtilis*, Medium MD).

- ▲ - Kontrolle
- △ - Actinomycin C (2,5 µg/ml)
- ● - Ethericin A (35 µg/ml)
- ○ - Ethericin A (19 µg/ml)
- ■ - Ethericin B (15 µg/ml)
- □ - Ethericin B (7,5 µg/ml)

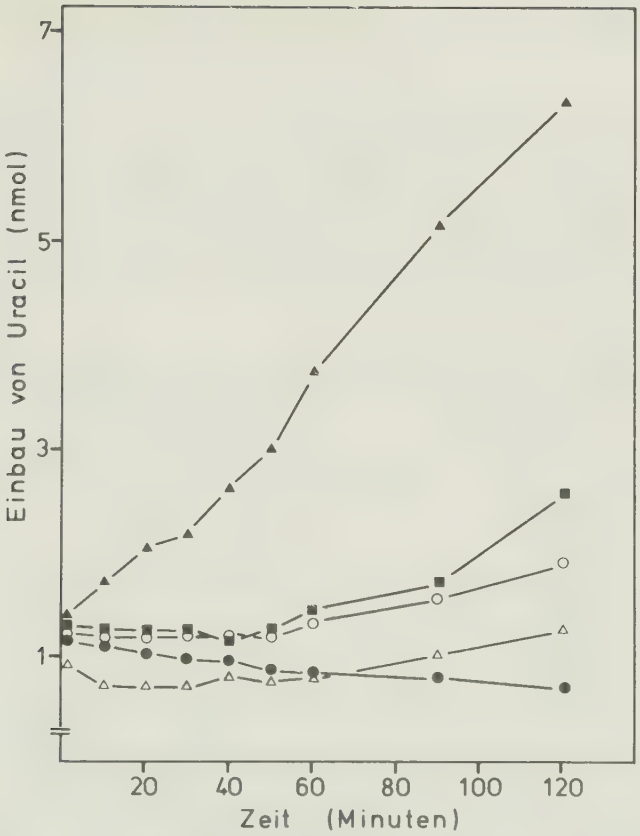


Abb. 13: Wirkung von Ethericin A und B auf die RNA-Synthese in vivo (*Bacillus subtilis*, Medium MD).

- ▲ - Kontrolle
- △ - Rifampicin (0,025 µg/ml)
- ● - Ethericin A (35 µg/ml)
- ○ - Ethericin A (19 µg/ml)
- ■ - Ethericin B (7,5 µg/ml)

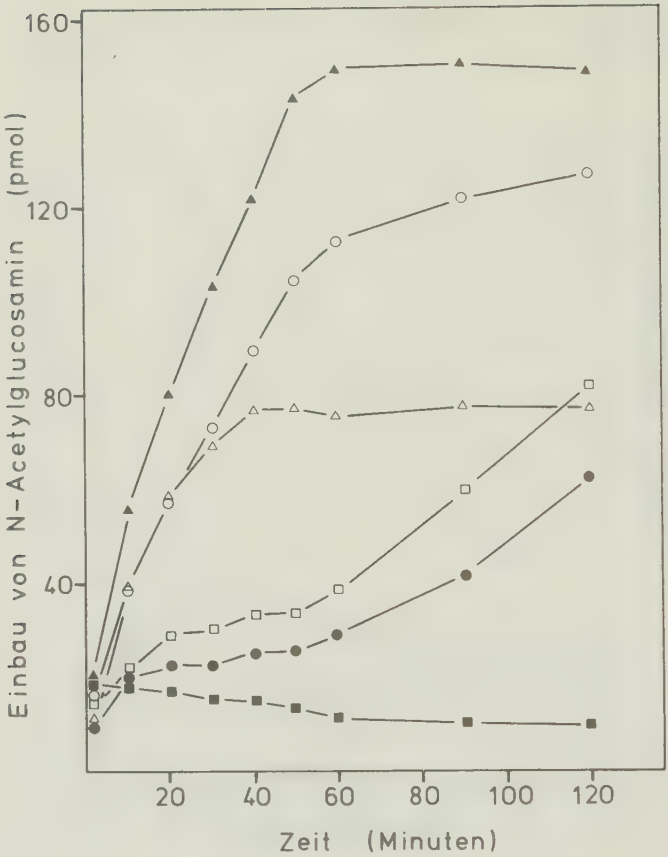


Abb. 14: Wirkung von Ethericin A und B auf die Murein-Synthese in vivo (*Bacillus subtilis*, Medium MD).

- ▲ - Kontrolle
- △ - Penicillin G (2,5 µg/ml)
- ● - Ethericin A (35 µg/ml)
- ○ - Ethericin A (19 µg/ml)
- ■ - Ethericin B (15 µg/ml)
- □ - Ethericin B (7,5 µg/ml)

3.4.2. Makromolekülsynthesen in vitro

3.4.2.1. Einfluß von Ethericin A und B auf die Proteinsynthese in vitro

Das verwendete Testsystem "Poly-U abhängige Poly-Phe Synthese" hatte sich bereits häufig bei Untersuchungen zur Wirkungsweise von Antibiotica bewährt (Wolf et al., 1972).
Wegen der relativ guten Wirkung in vivo sollte untersucht werden, ob vor allem Ethericin B die zellfreie Proteinsynthese stört (Tab. 4).

Tab. 4: Einfluß von Ethericin A und B auf die Poly-Phe-Synthese im zellfreien System von *Escherichia coli*.

Zeit (min)	Synthese (%)				
	Ethericin A µg/ml				Ethericin B
	25	50	100		100
5	99	100	90		99
10	96	87	73		100
20	95	70	64		100

Die in Tabelle 4 zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß Ethericin B auch in hohen Konzentrationen (bis 100 µg/ml) keinen Einfluß auf dieses Testsystem ausübt. Die Hemmwirkung von Ethericin A (100 µg/ml) war nur schwach, sie betrug 36 %. Vergleicht man diese Werte mit der Wirkung des Kirromycins, das bei einer Konzentration von 3,5 µg/ml die Proteinsynthese um 97 % vermindert (Wolf, 1971), so wird deutlich, daß die Ethericine A und B im Gegensatz zu Kirromycin keine spezifischen Hemmstoffe der Proteinsynthese in vitro sein können.

3.4.2.2. DNA-Synthese in Toluol-behandelten Zellen von *Bacillus subtilis*

Das hier verwendete Testsystem entspricht den Anforderungen, die an einen in vitro-Test gestellt werden müssen:
(a) normaler Replikationsablauf
(b) semikonservative Replikation
(c) Replikationsrate entspricht der in vivo-Rate
(d) normale biologische Aktivität der gebildeten DNA.
Die Erfüllung dieser Kriterien wurde für *Escherichia coli* (Moses und Richardson, 1970) und *Bacillus subtilis* (Matsushita et al., 1971) nachgewiesen.
Die Ergebnisse der Inkubation toluolisierter Zellen von *B. subtilis* Tü 203 mit Ethericin A und B sind in Abbildung 15 dargestellt. Während Ethericin B (100 µg/ml) keinen nennenswerten Einfluß auf die DNA-Synthese in vitro hat, hemmen 10 µg/ml Ethericin A den Einbau von Desoxy-Thymidintriphosphat in säurefällbares Material zu ca. 40 %.
Bei diesem Versuch zeigte sich, daß keine organischen Lösungsmittel verwendet werden dürfen, da beispielsweise bereits 1 % Äthanol im Testansatz genügten, um eine deutliche Hemmwirkung hervorzurufen.
Man könnte nun vermuten, daß generell lipophile Substanzen diesen Test stören, deshalb wurden Antibiotica mit bekanntem Wirkort geprüft (Chloramphenicol, Kirromycin; 10 µg/ml). Sie zeigten keinerlei Einfluß auf die DNA-Synthese in vitro.

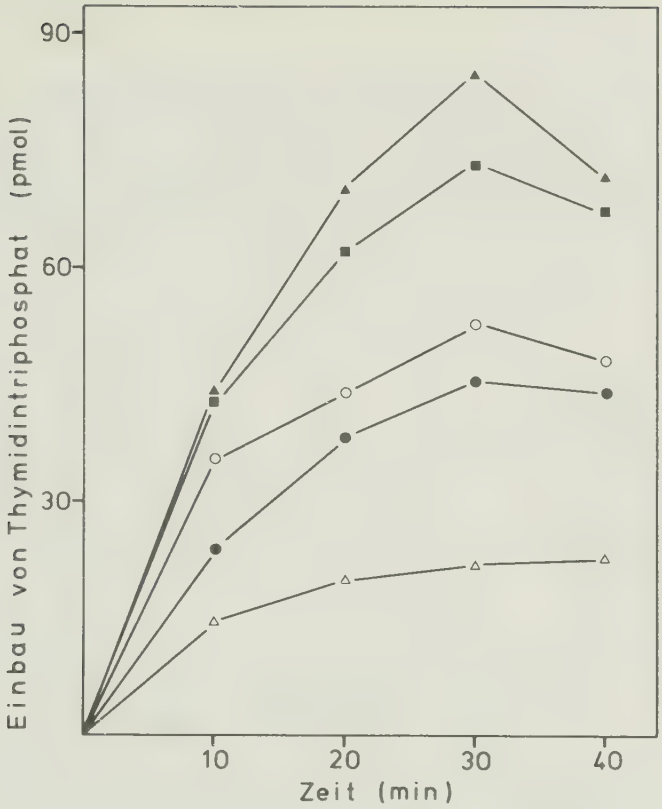


Abb. 15: Wirkung von Ethericin A und B auf die DNA-Synthese in Toluol-behandelten Zellen von *Bacillus subtilis*.

- ▲ - Kontrolle
- △ - Actinomycin C (10 µg/ml)
- ● - Ethericin A (100 µg/ml)
- ○ - Ethericin A (10 µg/ml)
- ■ - Ethericin B (100 µg/ml)

3.4.2.3. Einfluß von Ethericin A und B auf die RNA-Synthese in vitro

Die DNA-abhängige RNA-Polymerase synthetisiert aus den Ribonucleosid-Triphosphaten ATP, CTP, GTP und UTP unter Abspaltung von Pyrophosphat RNA-Moleküle nach den Gesetzen der Basenpaarung (Knippers, 1971). Die RNA-Synthese in vitro kann durch den Einbau eines radioaktiv markierten Nukleotids in säurefällbares Material verfolgt werden.

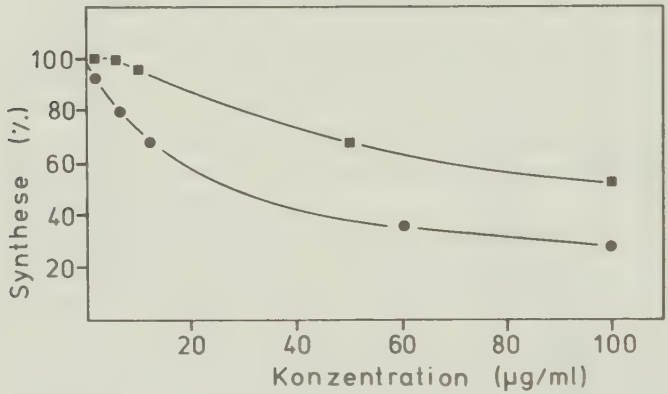


Abb. 16: Wirkung der Antibiotica Ethericin A und B auf die DNA-abhängige RNA-Polymerase von *Escherichia coli* (in vitro).

- ● - Ethericin A
- ■ - Ethericin B

100 µg/ml Ethericin B führen zu einer ca. 50 %igen Hemmung; der gleiche Effekt wird mit 28 µg/ml Ethericin A erreicht (Abb. 16). Die als Referenzsubstanzen getesteten RNA-Hemmstoffe Streptolydigin (10 µg/ml; Reusser, 1969) und Rifampicin (4 µg/ml; Kessler und Hartmann, 1977) ergaben eine Hemmung von 55 bzw. 97 %.

3.4.3. Hemmung der Atmungskette - Differenztest mit *Pichia farinosa*

Mit dieser Testanordnung können Hemmstoffe der Atmungskette erkannt werden. Die Hefe *Pichia farinosa* (Endomycetidae, Ascomycetes) wächst sowohl auf Glucose als auch auf Acetat als einziger Kohlenstoff-Quelle. Glucose als Energiequelle bietet der Hefe Möglichkeit zu Gärung und Atmung. Mit Acetat als einziger C-Quelle steht die Glykolyse nicht zur Verfügung, so daß die Atmungsketten-Phosphorylierung funktionsfähig sein muß. Zusätzlich begünstigen die Versuchsbedingungen (2.7.3.) entweder die Gärung oder die Atmung.
Atmungsketten-Hemmstoffe wie Venturicidin B (Brufani et al., 1968; Zähner, 1974) sollten mit Glucose als einziger Kohlenstoff-Quelle keine Hemmhöfe hervorrufen. Tabelle 5 zeigt die experimentelle Bestätigung dieser Annahme.

Tab. 5: Einfluß von Ethericin A und B auf die Atmungskette im Differenztest mit *Pichia farinosa* Tü 291.

Hemmhof (mm) mit	Venturicidin B		Ethericin A			Ethericin B	
	ug Substanz/Testrondelle						
	75	150	200	100	50	100	50
Glucose	0	0	12	10	7	7	6
Acetat	10	12	18	14	10	0	0

In der gleichen Versuchsserie (Tab. 5) zeigte Ethericin A zwar eine stärkere Wirkung bei Verwendung von Testplatten mit Acetat als C-Quelle, doch der Unterschied kann vermutlich durch das trotz gleicher Einsaatdichte bessere Wachstum von *P. farinosa* auf Glucose erklärt werden; die Atmung wird offensichtlich nicht spezifisch gehemmt.

Ethericin B rief nur auf Glucose eine erkennbare Hemmung hervor, was zumindest ebenfalls als Fehlen eines Einflusses auf die Atmungskette zu deuten ist.

3.4.4. Wirkung von Ethericin A und B auf bakterielle Membranen in vivo

3.4.4.1. Antagonisten von Ethericin A und B

Antagonisten eines Antibioticums lassen oft Rückschlüsse auf den Wirkort zu (Pache und Zähner, 1969). Beispielsweise können aus Lipidextrakten empfindlicher Organismen isolierte Substanzen Bindungsstellen für Antibiotica darstellen (Halder und Bose, 1971).
Aus diesen Gründen wurde versucht, Substanzen mit antagonisierender Wirkung auf die beiden Antibiotica zu finden. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse von Versuchen mit komplexen Präparaten, in Tabelle 7 solche mit definierten Verbindungen dargestellt.

Tab. 6: Aufhebung der Hemmwirkung von Ethericin A (15 mg/ml) und B (10 mg/ml) durch komplexe Präparate (Kreuztest, *Bacillus subtilis*, Medium TA).

Getestete Präparate	Ethericin A	Ethericin B
Casamino acids (100 mg/ml)	(+)	(+)
Eigelb (1:2 verdünnt, wäßrig)	-	(+)
Eigelb (Petrolätherextrakt)	-	(+)
Fleischextrakt (100 mg/ml)	(+)	(+)
Hefeextrakt (100 mg/ml)	+	(+)
Malzextrakt (100 mg/ml)	-	(+)
Pepton aus Casein (100 mg/ml)	+	+
Lipide aus *Bacillus subtilis* (1 mg/ml)	-	-

Erklärungen: - keine Antagonisierung
(+) undeutliche Antagonisierung
+ schwache Antagonisierung

Tab. 7: Aufhebung der Hemmwirkung von Ethericin A (15 mg/ml) und B (10 mg/ml) durch definierte Verbindungen (Kreuz- und Gradienten-Test; *Bacillus subtilis*, Medium TA).

Getestete Präparate	Ethericin A	Ethericin B
Tween 80 (1:10 verdünnt)	-	-
Vitamine (13 verschiedene, wasserlöslich)	-	-
Epiandrosteron (1 mg/ml)	+	-
Phosphatidyläthanolamin (1 mg/ml)	++	+
Andere Lipide (13, verschiedene Klassen)	-	-
Aminosäuren (biogene, 10 mM)	-	-
Citrat[1)]	-	+
Acetat, Isocitrat, Ketoglutarat, Pyruvat[1)]	-	-

Erklärungen: - keine A.; + schwache A.; ++ gute Antagonisierung
1) Medium TA ohne di-Ammoniumtartrat

Während Ethericin A und B durch eine ganze Reihe von komplexen Präparaten (Tab. 6) undeutlich oder schwach antagonisiert werden, scheinen die geprüften definierten Verbindungen (Tab. 7) mit Ausnahme von Phosphatidyläthanolamin (Ethericin A und B), Epiandrosteron (Ethericin A) und Citrat (Ethericin B) nicht in der Lage zu sein, diese Wirkung hervorzurufen.
Auf die Wirkung von Phosphatidyläthanolamin (PE) als Antagonist von Ethericin A und B könnten die unterschiedlichen minimalen Hemmkonzentrationen (vgl. Tab. 3) zurückzuführen sein. Während PE bei Gram-negativen Bakterien als Hauptkomponente der Phospholipide auftritt, wurden für Gram-positive Bakterien sehr unterschiedliche Anteile festgestellt (Shaw, 1974). Die gegen Ethericin A und B empfindlichsten Testkeime, der Gram-positive *Bacillus subtilis* und der Gram-negative *Proteus vulgaris* enthalten 40 bzw. 73 % PE im Lipid. *B. subtilis* gehört damit zur am meisten PE enthaltenden Gruppe von Gram-positiven Bakterien (Goldfine, 1972).

Aus den hohen PE-Werten der empfindlichsten Testkeime und der Beobachtung, daß aus *B. subtilis* isolierte Lipide keine Antagonisierung bewirkten, könnte der Schluß gezogen werden, daß der PE-Gehalt der Testzellen keinen Einfluß auf die Wirkhöhe der Antibiotica hat. Einschränkend muß jedoch bemerkt werden, daß die PE-Anteile von Stamm zu Stamm stark schwanken können und außerdem durch weitere Faktoren wie pH-Wert und Wachstumsphase beeinflußt werden können (Shaw, 1974).

3.4.4.2. Test auf grobe Membranschädigung

Der Verlust von cytoplasmatischem Material kann als Hinweis auf eine Änderung der Membranpermeabilität dienen (Gale et al., 1972).
In der folgenden Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Einwirkung von Ethericin A und B auf *Bacillus subtilis* in Medium nach Davis und Mingioli (mit Glucose) und Tris-HCl (pH 7) dargestellt. Gemessen wurden die UV-Absorptionen bei 260 und 280 nm als Indikatoren für einen Ausfluß von Nukleotiden bzw. Proteinen.
Um Verfälschungen des Ergebnisses durch die Eigenabsorption der Antibiotica zu vermeiden, wurde in Tabelle 8 die Extinktionsdifferenz der Proben bei 20 und 60 Minuten, sowie zum Vergleich die Veränderung der Extinktion ohne Zellen angegeben.

Tab. 8: Austritt von UV-absorbierendem Material aus Zellen von *Bacillus subtilis* unter Einfluß der Antibiotica Ethericin A und B.

Wellenlänge (nm)	Zellsuspension in:	Probe Ethericin A (50 µg/ml)	Kontrolle Ethericin A (50 µg/ml) (ohne Zellen)	Probe Ethericin B (50 µg/ml)	Kontrolle Ethericin B (50 µg/ml) (ohne Zellen)	Kontrolle (ohne Antibiotica, mit Zellen)
260	Tris-HCl	0,19	0,18	0	0	0,01
280	Tris-HCl	0,03	0,06	0	0	0,01
260	Medium MD	0,1	0,18	0,1	0	0
280	Medium MD	0,03	0,06	0,13	0	0

Aus Tabelle 8 kann abgelesen werden, daß der Extinktionsanstieg bei Behandlung von Bakterienzellen mit Ethericin A auf einem Anstieg der Extinktion des Antibioticums beruht. Im Gegensatz dazu kann ein deutlicher Ausfluß von absorbierendem Material bei Behandlung von *Bacillus subtilis* mit Ethericin B in Medium nach Davis und Mingioli (mit Glucose) festgestellt werden.

Entgegen den Erwartungen wurde mit Lipomycin (1,7 µg/ml) kein Ausfluß von absorbierendem Material erreicht. Dies steht in Gegensatz zu Kunze (1975), könnte jedoch durch Aktivitätsverluste bei der Lagerung von Lipomycin erklärt werden (B. Kunze, persönliche Mitteilung).

3.4.5. Wirkung auf die Cytoplasmamembran, Versuche mit Membranvesikeln

3.4.5.1. Einfluß von Ethericin A und B auf die Aktivität der membrangebundenen ATPase

Der membrangebundenen ATPase kommt eine große, noch nicht völlig verstandene Bedeutung bei der oxidativen Phosphorylierung, sowie dem Aufbau eines pH-Gradienten und einer Potentialdifferenz zu (Salton, 1974).
Um näheren Aufschluß über die Wirkungsweise von Ethericin A und B zu erhalten sollte geprüft werden, ob ein Eingriff in diese Funktionen der Hemmwirkung zugrundeliegt.
Die Versuche wurden mit Vesikeln aus *Bacillus subtilis* durchgeführt, deren ATPase-Aktivität vergleichbar anderen Präparationen war:

Bacillus subtilis	0,35 µmol ATP/min/mg
Escherichia coli (Hare, 1975)	0,42 µmol ATP/min/mg
Brevibacterium ammoniagenes (Thaler, 1977)	0,34 µmol ATP/min/mg

Im hier verwendeten Testansatz (2.7.5.3.) waren Vesikel aus *B. subtilis* und *E. coli* gegen Ethericin A und B nahezu gleich empfindlich. Eine Vorinkubation der Vesikel aus *B. subtilis* mit oder ohne Magnesium im Testansatz, hatte im Stabilitätsbereich des Enzyms keinen Einfluß auf die antibiotische Wirkung.

Die Ergebnisse mit Ethericin A sind in Abbildung 17 dargestellt. Die Hemmwirkung ist deutlich; ihre Intensität hängt von der Dauer der Vorinkubation der Vesikel mit dem Antibioticum ab. Im Vergleich zum spezifischen Hemmstoff DCCD (Harold, 1972), der in einer Konzentration von 1 µg/ml ohne Vorinkubation eine 82 %ige Hemmung hervorruft, werden jedoch sehr hohe Konzentrationen von Ethericin A benötigt.
Im Gegensatz zu Ethericin A ist der durch Ethericin B (Abb. 18) hervorgerufene Effekt wenig oder nicht zeitabhängig. Bereits mit ca. 30 % der Konzentration kann allerdings die gleiche Hemmwirkung wie bei Ethericin A erreicht werden. Eine spezifischere Hemmung des verwendeten Testsystems kann zumindest für Ethericin B nicht ausgeschlossen werden.

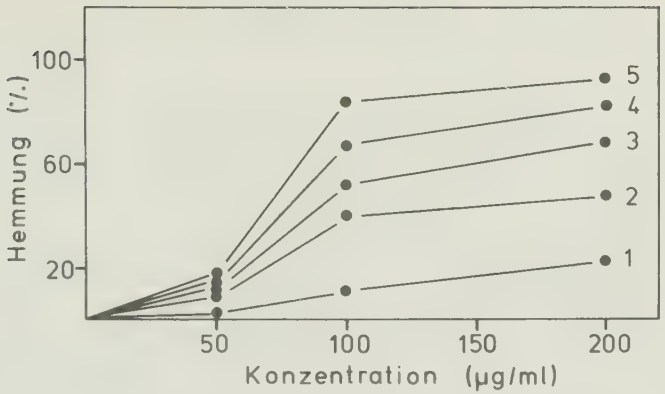


Abb. 17: Hemmung der ATPase-Aktivität in Membranvesikeln aus *Bacillus subtilis* in Abhängigkeit von der Konzentration des Antibioticums Ethericin A und der Zeit.

Dauer der Vorinkubation mit Ethericin A:

(1) 10 min (2) 20 min (3) 30 min
(4) 60 min (5) 120 min

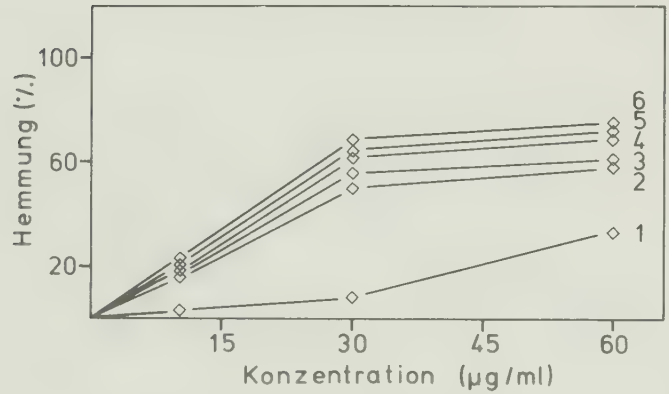


Abb. 18: Wirkung von Ethericin B auf die ATPase-Aktivität in Membranvesikeln aus *Bacillus subtilis* in Abhängigkeit von der Dauer der Vorinkubation mit dem Antibioticum.

Vorinkubation:

(1) 15 min (2) 30 min (3) 45 min
(4) 60 min (5) 90 min (6) 120 min

3.4.5.2. Wirkung von Ethericin A und B auf den Transport von [^{3}H]-Prolin in Membranvesikeln

Membranvesikel transportieren, falls Energie zur Verfügung steht, ein breites Spektrum von Metaboliten. Die Umsetzung dieser Substanzen im Stoffwechsel ist minimal, so daß Membranvesikel Aussagen über die an Transportvorgängen beteiligten Komponenten zulassen (Kaback, 1974).
Auf der chemiosmotischen Theorie von Mitchell aufbauend wurden Erklärungsmodelle für Transportvorgänge in Bakterien entworfen (Harold, 1972; Walsh und Kaback, 1974; West, 1970). Das im Versuch verwendete ungeladene Prolin wird danach im Symport mit Protonen als Antwort auf die Gesamtheit der "proton motive force", die sich aus Membranpotential und pH-Gradient ergibt, transportiert (Harold et al., 1974; Harold, 1976).
Als Energieträger für *Bacillus subtilis* (Konnings und Freese, 1972) sowie für *Escherichia coli* und andere Bakterien (Kaback, 1974) eignet sich Li-Lactat, das auch für die Ansätze mit Ethericin A und B benutzt wurde.
Die nach 2.7.5.2. hergestellten Membranvesikel aus *B. subtilis* zeigten nur schwache Transportkapazitäten für Prolin. Die Hauptversuche wurden deswegen mit Vesikeln aus *E. coli* durchgeführt.
Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 19 dargestellt. Ethericin A übt einen Effekt auf den Prolin-Transport aus, der wegen der benötigten hohen Konzentrationen wahrscheinlich nicht als spezifisch betrachtet werden kann. Ethericin B zeigt bei hoher Dosierung sehr gute Wirkung, die jedoch mit der Konzentration rasch abfällt. Die Möglichkeit des Eingriffs in Mechanismen des aktiven Transports kann zumindest für diese Substanz nicht ausgeschlossen werden.

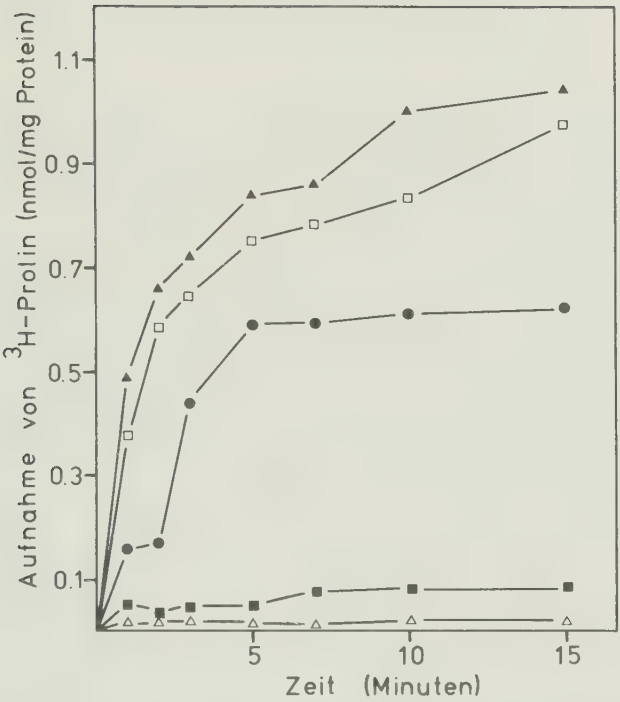


Abb. 19: Wirkung der Antibiotica Ethericin A und B auf den Transport von Prolin in Membranvesikeln aus *Escherichia coli*.

- ▲ - Kontrolle (Transport)
- △ - Kontrolle (ohne Lactat)
- ● - Ethericin A (100 µg/ml)
- ■ - Ethericin B (100 µg/ml)
- □ - Ethericin B (10 µg/ml)

3.4.6. Wechselwirkung mit Ionen, Versuche in vivo

3.4.6.1. Streifengradienten-Test

Mit Hilfe dieser Testanordnung (2.6.1.3.) sollte untersucht werden, ob die Wirkung von Ethericin A und B auf *Bacillus subtilis* durch die Ionen Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+} und Fe^{3+} beeinflußt wird. Während Ethericin B keinerlei Wechselwirkungen mit den getesteten Ionen erkennen ließ, konnten schwache antagonisierende Effekte des Erdalkali-Ions Ca^{2+} (Gradient von 0-0,1 M; Medium NB) auf Ethericin A festgestellt werden. Im gegenläufigen Gradienten mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (jeweils Gradient von 0-0,1 M; Medium NB) wurde die antagonisierende Wirkung der Calcium-(II)-Ionen durch Magnesium-(II)-Ionen, die allein keinen Einfluß auf die antibiotische Wirkung von Ethericin A hatten, teilweise aufgehoben.
Versuche zur Feststellung der Wechselwirkung mit Ionen sind sehr stark von den gewählten Bedingungen abhängig (Ionenkonzentration; pH-Wert; Konformation und Konzentration des Antibioticums). In dieser Komplexität sind vermutlich auch die Gründe für die Nichtübertragbarkeit der Ergebnisse auf Flüssig-Kulturen zu suchen. Die Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen bei der Untersuchung von Ionen-Antibiotica-Wechselwirkungen wurden bereits für den Ionophor A 23187 (Pfeiffer und Lardy, 1976) und das polyenartige Antibioticum Lipomycin (Kunze, 1975) beschrieben.

3.4.6.2. Wechselwirkung mit EDTA im Kreuztest

Zur Überprüfung der Frage, ob die EDTA-Wirkung auf einer groben Membranschädigung beruht, oder ob spezifische Wechselwirkungen mit Antibiotica festgestellt werden können, wurden Kreuztests mit EDTA (0,01 M) und verschiedenen Antibiotica durchgeführt (Tab. 9).

Tab. 9: Wechselwirkung verschiedener Antibiotica mit EDTA (0,01 M) im Kreuztest (*Bacillus subtilis*, Medium NB).

Antibioticum	Konzentration (mg/ml)	Wirkung mit EDTA
A 22765	5	++
Albomycin	10	+
Actinomycin C	1	-
Chloramphenicol	1	-
Desferri-Triacetylfusigen	10	-
Ethericin A	30	++
Ethericin B	10	-
Ferrimycin	1,8	-
Lipomycin	10	-
Magnesidin	2	++
Nonactin	10	-
Oleficin	2	-
Oxytetracyclin	5	+
Penicillin G	1	-
Rifampicin	0,1	-
Tirandamycin A	2	-
Tirandamycin B	2	-
Valinomycin	10	-

Erklärungen: - keine Verstärkung der Antibioticawirkung
+ schwache Verstärkung
++ gute Verstärkung

Nur 5 von 18 getesteten Antibiotica wurden in ihrer Wirkung durch EDTA verstärkt (Tab. 9). Aus diesem Grund kann eine allgemeine Schädigung der Zellhülle durch EDTA und als Folge eine bessere Eindringung und Wirkung aller Antibiotica ausgeschlossen werden.

3.4.6.3. Biophotometer-Versuche mit EDTA

Mit Hilfe des Biophotometers sollte der verstärkende Effekt von EDTA auf die Wirkung des Antibioticums Ethericin A mit *Bacillus subtilis* als Testorganismus eingehender untersucht werden. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse dargestellt. Die unterbrochen gezeichneten Kurven stellen die Hemmwirkung der jeweiligen EDTA-Konzentration dar. Es wird ersichtlich, daß durch Zusammenwirkung von EDTA und Ethericin A eine Verstärkung des Hemmeffektes eintritt. Niedrige Konzentrationen (1 µM) ergaben keine Beeinflussung der Antibioticawirkung und des Wachstums von *B. subtilis*.

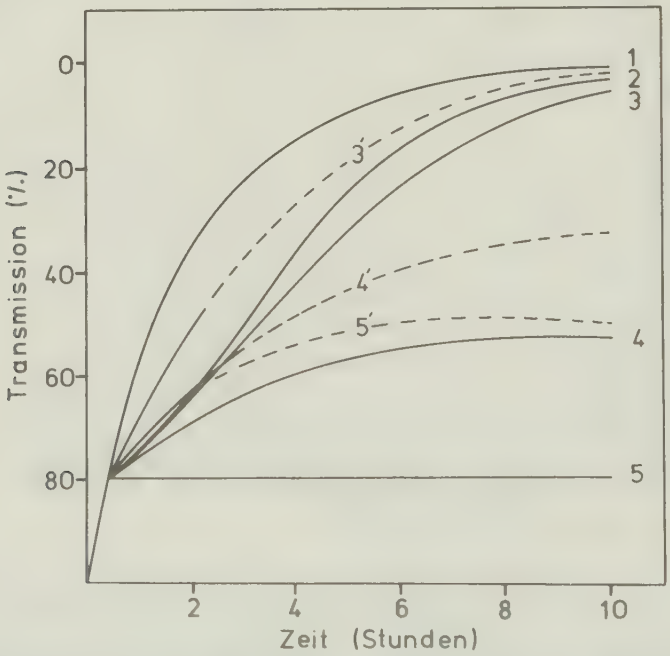


Abb. 20: Wirkung von EDTA und Ethericin A auf das Wachstum von *Bacillus subtilis* in synthetischer Nährlösung.

1 Kontrolle (ohne Antibioticum, ohne EDTA)
2 Ethericin A (8,6 µg/ml)
3 Ethericin A (8,6 µg/ml) + 10 µM EDTA
4 Ethericin A (8,6 µg/ml) + 1 mM EDTA
5 Ethericin A (8,6 µg/ml) + 10 mM EDTA
3', 4', 5' Kontrollen nur mit EDTA (3, 4, 5 entsprechende Konzentration)

3.4.7. Wechselwirkungen mit Ionen, chemisch-physikalische Untersuchungen

3.4.7.1. Pikrat-Test

Der unter 2.7.6. beschriebene Test bietet eine Möglichkeit zur Untersuchung der Komplexbildung mit einwertigen Kationen und kann deshalb zur quantitativen Bestimmung komplexbildender Substanzen, z.B. Makrotetrolid-Antibiotica, verwendet werden (Suzuki et al., 1971).
Im Versuch bildeten Ethericin A und B keine Komplexe mit Na^+-Ionen. Das negative Ergebnis stimmt mit Befunden in vivo und an schwarzen Lipidfilmen überein. Das als Kontrolle getestete Nonactin ergab die erwartete positive Reaktion (organische Phase gelb).

3.4.7.2. Extraktionsversuche mit Ethericin A im zweiphasigen System

Zur Überprüfung der Komplexbildungs-Fähigkeit von Ethericin A mit Ca^{2+}- und Fe^{3+}-Ionen wurden Extraktionsversuche durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tab. 10: Extraktion im zweiphasigen System (Ethericin A 0,1 mM; Toluol/Butanol = 70/30 (v/v); Tris-HCl 50 mM; Mittelwerte aus 3 Versuchen).

Ionen	Tris-HCl pH-Wert	Komplexbildner (2 mM)	gemessene Radioaktivität (cpm) Leerwert[1]	Probe[2]
Ca^{2+} (5 mM)	6	-	34	24
	7	-	27	29
Fe^{3+} (5 mM)	6	-	12	141
	7	-	14	321
	7	-	Niederschlag 9021 cmp	
Fe^{3+} (1 mM)	7	EDTA	12	18
	7	Nitrilotriacetat	14	14
	7	Na-Citrat	11	13
	7	Desferri-Ferricrocin	75	86

1) ohne Ethericin A 2) mit Ethericin A

Aus Tabelle 10 kann abgelesen werden, daß unter den gewählten Bedingungen Ethericin A keine Calciumionen in die organische Phase überführte. Demgegenüber wurden Fe^{3+}-Ionen bei pH 6 und besser bei pH 7 komplexiert und aus der wäßrigen Phase extrahiert. Dies schlug sich auch in Farbverschiebungen während des Versuches nieder. Die braun gefärbte Lösung von Eisenchlorid in Tris-Puffer wurde im Verlauf des Versuches entfärbt, die organische Phase erhielt ein topasfarbenes Aussehen. Nach dem Zentrifugieren stellte sich dies als Mischfarbe aus gelber Oberphase (Chinon) und schwarzem Niederschlag heraus, der sich an der Phasengrenzfläche ansammelte. Dieser Niederschlag enthielt den Hauptteil der eingesetzten Radioaktivität.

Ethericin A war unter den gewählten Bedingungen nicht in der Lage, den Eisen-komplexierenden Agentien EDTA, Nitrilotriacetat, Citrat und Desferri-Ferricrocin Ionen zu entziehen.

3.5. Versuche mit Lymphocyten[1)]

3.5.1. Einfluß von Ethericin A und B auf den Einbau von [^{3}H]-Thymidin in Mäusemilzzellen

Lymphocyten können als Modelle zum Studium der Zelldifferenzierung und Zellproliferation verwendet werden.
Die Transformation von Lymphocyten kann durch Antigene oder unspezifische Mitogene wie Concanavalin A (Nicolson, 1976) und andere Lektine (Sharon und Lis, 1972) sowie Lipoprotein aus der äußeren Membran von *Escherichia coli* (Melchers et al., 1975; Bessler und Braun, 1975) ausgelöst werden. Der Mechanismus dieser Stimulation ist weitgehend unbekannt.
Von Maino und Mitarbeitern (1974) wurde beschrieben, daß der für zweiwertige Ionen spezifische Ionophor A 23187 (Reed und Lardy, 1972) Lymphocyten aus mesenterialen Schweinelymphknoten zur Proliferation anregen kann. Ratten- und Mäusemilzzellen erwiesen sich als zu empfindlich gegen den toxischen Effekt des Antibioticums.
Aus Abbildung 21 wird als Effekt von Ethericin A eine schwache, jedoch signifikante Anregung des Thymidin-Einbaus in Mäusemilzzellen (Stimulationsfaktor ca. 3) ersichtlich.
Versuche, durch Zugabe von Polyäthylenglykol 6000 (4,5 %) und 10000 (1 %)die Stimulation zu erhöhen (Bessler et al., 1977b), brachten ebensowenig Erfolg wie der Versuch, das Antibioticum Ethericin A nach 6 Stunden Einwirkzeit durch Waschen zu entfernen (Luckasen et al., 1974).
Im Gegensatz zu Ethericin A hatte Ethericin B keinen Einfluß auf den Einbau von [^{3}H]-Thymidin in Mäusemilzzellen.

---

1) Ich danke Herrn Dr. W. Bessler, der mir diese Versuche ermöglichte und mich durch viele wertvolle Ratschläge und Diskussionen unterstützte, sowie Frau B. Ottenbreit für die freundliche Hilfe und die Durchführung einiger Tests.

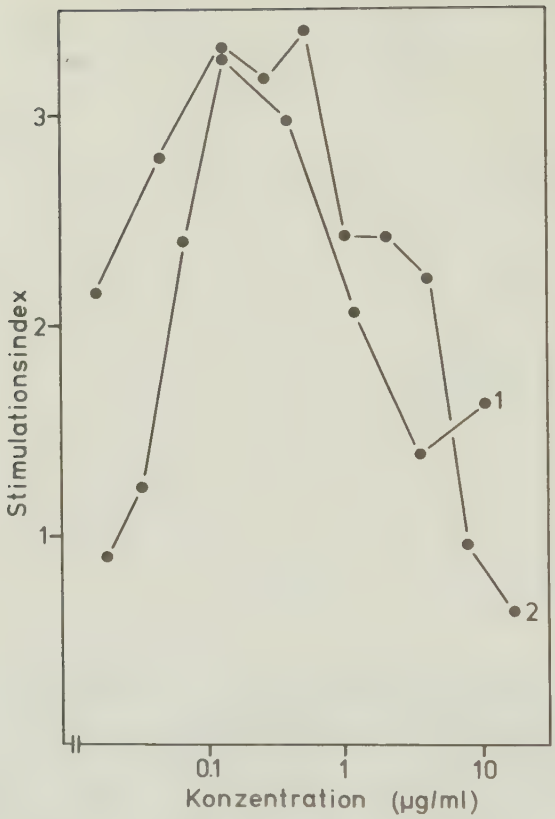


Abb. 21: Aufnahme von [^{3}H]-Thymidin in Mäusemilzzellen nach Stimulation durch Ethericin A (Mittelwerte aus 6 Versuchen).

- 1 - Mäusestamm C3H/HeJ; Kontrolle 98 cpm
- 2 - Mäusestamm C57Bl/6J; Kontrolle 46 cpm

3.5.2. Wirkung von Ethericin A auf die Con A-induzierte Stimulation von Mäusemilzzellen

Bei der Behandlung von Mäusemilzzellen mit Concanavalin A werden diese zur Differenzierung und Proliferation angeregt. Verwendet man reine B-Lymphocytenpräparationen, so tritt keine Aktivierung ein; daraus kann eine Wirkung von Con A auf T-Zellen abgeleitet werden.
Andersson und Melchers (1976) beschrieben den Einfluß von Mitomycin C, einem Hemmstoff der Nukleinsäuresynthese, auf den Con A-stimulierten Einbau von [^{3}H]-Thymidin in Mäusemilzzellen. Die Vorbehandlung der Lymphocyten mit diesem Antibioticum bewirkte eine nahezu totale Hemmung der Thymidinaufnahme.
Abbildung 22 zeigt den Einfluß von Ethericin A (0,1 µg/ml) auf die Thymidin-Incorporation von Mäusemilzzellen, einer Mischung von B- und T-Zellen, stimuliert durch Concanavalin A.
Ethericin A bewirkt wie Mitomycin C eine deutliche Hemmung (95 %) des Con A-induzierten Thymidineinbaus.

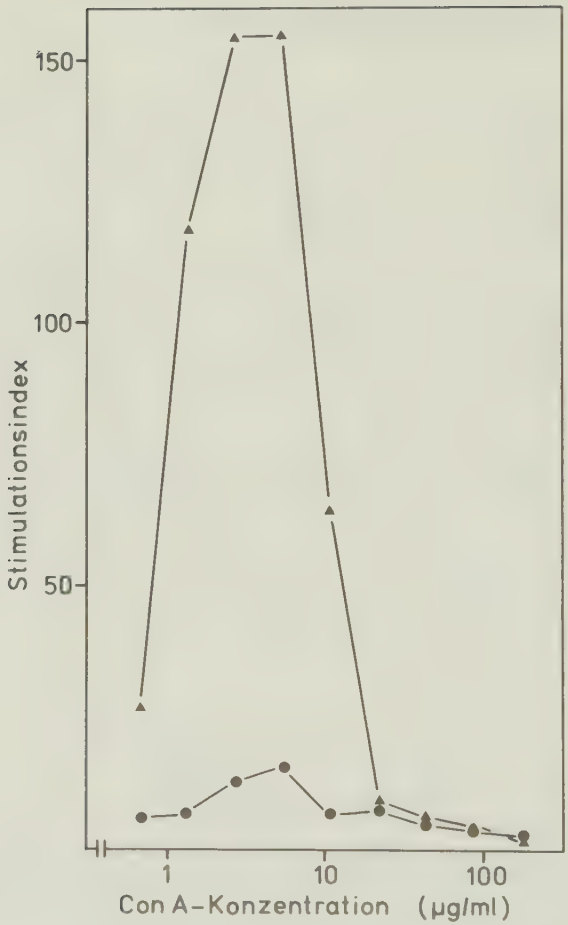


Abb. 22: Wirkung von Ethericin A auf die durch Concanavalin A hervorgerufene Stimulation von Mäusemilzzellen (Stamm C3H/HeJ; Mittelwerte aus 6 Versuchen).

- ▲ - Concanavalin A; Kontrolle 120 cpm

- ● - Concanavalin A + Ethericin A (0,1 µg/ml Endkonzentration); Kontrolle 60 cpm

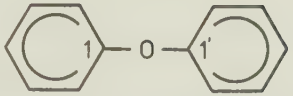
4. A N H A N G

Natürlich vorkommende Diphenylether

In der folgenden Zusammenstellung sind nur solche Substanzen aufgeführt, die als Grundstruktur ausschließlich eine Diphenylether-Gruppierung besitzen und keine größeren funktionellen Reste an den beiden aromatischen Ringen zeigen.

Produzenten:

(1) *Aspergillus brevipes* (Pilze, Moniliaceae)
(2) *Aspergillus brunneo-uniseriatus* (Pilze, Moniliaceae)
(3) *Aspergillus fumigatus* (Pilze, Moniliaceae)
(4) *Aspergillus funiculosus* (Pilze, Moniliaceae)
(5) *Aspergillus rugulosus* (Pilze, Moniliaceae)
(6) *Aspergillus terreus* (Pilze, Moniliaceae)
(7) *Bifurcaria bifurcata* (Braunalgen, Fucaceae)
(8) *Castanea vesca* (Samenpflanzen, Fucaceae)
(9) *Cystoseira tamariscifolia* (Braunalgen, Cystoseiraceae)
(10) *Dysidea herbacea* (marine Schwämme, Dysideidae)
(11) *Himanthalia elongata* (Braunalgen, Fucaceae)
(12) *Laminaria ochroleuca* (Braunalgen, Laminariaceae)
(13) *Oospora sulphurea-ochracea* (Pilze, Moniliaceae)
(14) *Penicillium frequentans* (Pilze, Moniliaceae)
(15) Sphaeropsidales (unbestimmter Pilz)
(16) *Xanthorrhoea preisii* (Samenpflanzen, Liliaceae)



Summenformel	MW	systematischer Name	Bemerkungen Trivialnamen	Produzenten	Literatur
$C_{12}H_5O_2Br_5$	581	4,6,2',3',4'-Pentabromo-6'-hydroxydiphenylether	-	10	Sharma und Vig (1972)
$C_{12}H_8O_2Br_2$	344	4,2'-Dibromo-6'-hydroxydiphenylether	-	10	Sharma und Vig (1972)
$C_{12}H_{10}O_6$	250	2,4,6,3',5'-Pentahydroxydiphenylether	Diphlorethol	7 9 11 12	Glombitza et al. (1976a) Glombitza et al. (1975) Glombitza et al. (1977a) Glombitza et al. (1976b)
$C_{12}H_9ClO_6$	284	Monochloro-pentahydroxydiphenylether	Monochloro-diphlorethol	12	Glombitza et al. (1977b)
$C_{12}H_{10}O_7$	266	3,4,5,2',4',6'-Hexahydroxydiphenylether	Bifuhalol	7 9	Glombitza und Rösener (1974) Glombitza et al. (1975)
$C_{13}H_{12}O_2$	200	Methoxydiphenylether	-	16	Rennie et al. (1920)
$C_{14}H_{10}O_{10}$	338	2,3'-Dicarboxy-4,5,6,5',6'-pentahydroxydiphenylether	Dehydro-digallussäure	8	Mayer (1952)
$C_{14}H_{14}O_3$	230	3,3'-Dihydroxy-5,5'-dimethyldiphenylether	-	5	Ballantine et al. (1968)

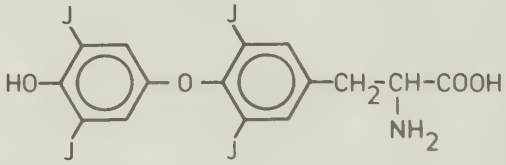
$C_{14}H_{14}O_5$	262	2,2',3,3'-Tetrahydroxy-5,5'-dimethyldiphenylether	Ethericin A	1 2 4	G.-U. Brillinger (persönliche Mitteilung) G.-U. Brillinger (persönliche Mitteilung)
$C_{14}H_{14}O_5$	262	Tetrahydroxy-dimethyldiphenylether	Isomer zu Ethericin A	4	
$C_{15}H_{14}O_5$	274	4-Carboxy-5,5'-dihydroxy-3,3'-dimethyldiphenylether	-	3	Yamamoto et al. (1972)
$C_{15}H_{16}O_4$	260	2,3'-Dihydroxy-4-methoxy-6,5'-dimethyldiphenylether	Antibioticum LL-V 125 α	15	McGahren et al. (1970) Cannon et al. (1971)
$C_{16}H_{14}O_8$	334	2,2'-Dicarboxy-4,3'-dihydroxy-6-methoxy-5'-methyldiphenylether	Methylosoic acid Dimethylasterric acid	6 13	Grove (1973)
$C_{17}H_{14}O_8Cl_2$	416	2'-Carboxy-4',6'-dichloro-4-hydroxy-2-methoxycarbonyl-5'-methyldiphenylether	Geodin Hydrat	6	Turner (1971)
$C_{17}H_{16}O_8$	348	2'-Carboxy-4,3'-dihydroxy-6-methoxy-2-methoxycarbonyl-5'-methyldiphenylether	Dimethylosoic acid Asterric acid	6 13 14	Grove (1973) Natori und Nishikawa (1962) Mahmoodian und Stickings (1964)
$C_{17}H_{18}O_5$	302	4'-Carboethoxy-3,3'-dihydroxy-5,5'-dimethyldiphenylether	Ethericin B	4	
$C_{18}H_{18}O_8$	362	4,3'-Dihydroxy-6-methoxy-2,2'-dimethoxycarbonyl-5'-methyldiphenylether	Trimethylosoic acid Methyl asterrate	13	Grove (1973)
$C_{19}H_{18}O_9$	390	3'-Acetoxy-2'-carboxy-4-hydroxy-6-methoxy-2-methoxycarbonyl-5'-methyldiphenylether	-	13	Grove (1973)

5. DISKUSSION

5.1. Diphenylether

Verbindungen des Diphenylether-Typus sind in der Natur relativ häufig. Sie konnten bisher aus Algen (Glombitza, 1977), Pilzen (Turner, 1971), höheren Pflanzen (Humphries, 1967) und marinen Schwämmen (Sharma und Vig, 1972) isoliert werden. Eine Diphenylether-Gruppierung findet man auch bei einem der am längsten bekannten Hormone, dem Schilddrüsenhormon Thyroxin (Abb. 23) und seiner nichtjodierten Stammsubstanz Thyronin (Karlson, 1972).

Abb. 23: Strukturformel von Thyroxin



Einige kompliziert gebaute Alkaloide wie Trilobin, Berbamin und Curin (Mayer, 1952) enthalten ebenfalls Diphenylether-Gruppierungen. Außerdem sind hier noch einfach gebaute Diphenylether zu erwähnen, wie sie durch den Abbau gewisser - Depsidone genannter - Flechteninhaltsstoffe entstehen (Asahani und Shibata, 1954). Die alkalische Methanolyse der Depsidone führt zum Bruch der Depsidbindung, es bilden sich Diphenylether (Abb. 24; Huneck und Lamb, 1975).
Im folgenden sollen nur biogene Substanzen diskutiert werden; es gelten die gleichen Einschränkungen wie bei der im Anhang (4.) zusammengestellten Liste von Diphenylethern.
Bei den Braunalgen-Produkten handelt es sich um reine Polyhydroxy-diphenylether, die als niedermolekulare Glieder einer homologen Reihe aufgefaßt werden können. Dabei zeigen zumindest die höheren Glieder typische Gerbstoffeigenschaften (Glom-

bitza und Sattler, 1973). Diese phenolischen Braunalgengerbstoffe (Phlorotannine) werden in den Physoden gebildet und können gespeichert oder ins umgebende Medium ausgeschieden werden. Ihnen scheint aufgrund ihrer antibakteriellen und antialgalen Eigenschaften, sowie in Zusammenhang mit der Abwehr von Herbivoren, eine erhebliche Bedeutung in der Ökologie von Braunalgenbeständen zuzukommen (Glombitza, 1977).

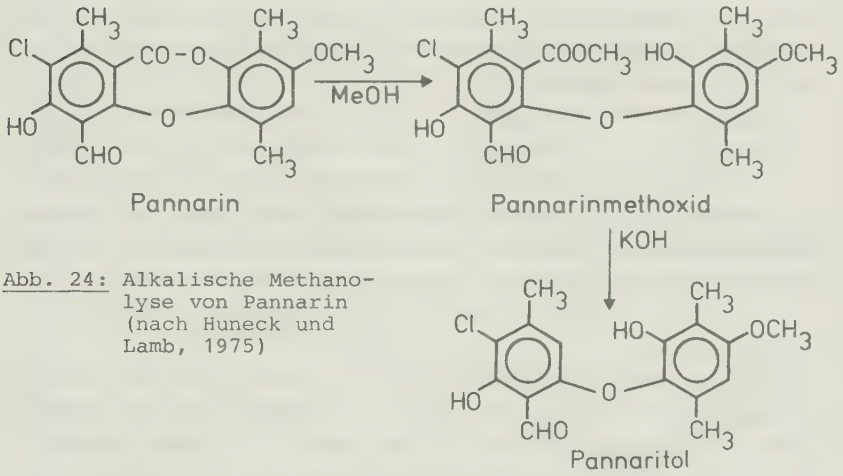


Abb. 24: Alkalische Methanolyse von Pannarin (nach Huneck und Lamb, 1975)

Die aus Blättern der Edelkastanie (*Castanea vesca*) isolierte Dehydro-digallussäure kann ebenfalls zu den Gerbstoffen gezählt werden. Sie spielt in der Biosynthese der Tannine eine Rolle (Humphries, 1967).

Die überwiegende Zahl der bisher beschriebenen einfachen Diphenylether stammt aus imperfekten Pilzen, wobei sich die Gattung *Aspergillus* als besonders leistungsfähig erwies. Die Biosynthese der Diphenylether wurde mit *Aspergillus*-Stämmen eingehender untersucht, die vermutlichen Zusammenhänge sind bei Turner (1971) dargestellt.

Vichkanova und Mitarbeiter (1974) testeten eine Reihe von synthetischen Diphenylethern gegen *Mycobacterium tuberculosis*. Sie fanden einerseits eine bessere Wirkung bei Methylierung der phenolischen Gruppen, andererseits waren ionisierbare Strukturen von Bedeutung. Tetrandin-ähnliche Alkaloide wirkten am besten; Ethericin A und B strukturell ähnliche Verbindungen wurden nicht beschrieben.
Steinhoff (1977) untersuchte die biologische Wirkung des 4,4'-Diamino-diphenylethers an Ratten. Nach subkutaner Verabreichung (100 - 300 mg/kg wöchentlich, bis 670 Versuchstage) stellte er ausgeprägte Lebertoxizität und bei 25 % der Tiere Induktion bösartiger Lebertumoren fest.
Ein Vergleich von Ethericin A und B mit den im Anhang (4.) zusammengestellten Diphenylethern ist schwierig, da die biologischen Eigenschaften und sonstigen Charakteristika der meisten Verbindungen nur ungenügend beschrieben sind. Trotzdem soll im folgenden versucht werden, einige herausragende Eigenschaften der Ethericine im Vergleich aufzuzeigen.

a) Chemie

Ethericin A unterscheidet sich von fast allen hier dargestellten Diphenylethern durch die symmetrische Anordnung der Substituenten und das ausschließliche Auftreten von Hydroxyl- und Methylgruppen an den aromatischen Ringen (Abb. 7). Der 3,3'-Dihydroxy-5,5'-dimethyldiphenylether aus *Aspergillus rugulosus* besitzt die gleichen Struktureigenschaften, allerdings fehlen die für die Wirkung von Ethericin A vermutlich entscheidenden Hydroxylgruppen in 2,2'-Stellung (siehe 5.2.). Nur die von Mayer (1952) beschriebene Dehydro-digallussäure zeigt ebenfalls eine 2,2',3,3'-Substitution, ist jedoch im Gegensatz zu Ethericin A in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich. Die zu Ethericin A isomere Verbindung aus *A. funiculosus* ist wahrscheinlich nicht symmetrisch (3.2.5.1.), an der Strukturaufklärung wird noch gearbeitet.
Yamamoto und Mitarbeiter (1972) beschrieben eine mit Ethericin B nahe verwandte Substanz aus *Aspergillus fumigatus*, es handelt sich um die freie Säure des Ethericin B. Eine gewisse

Strukturähnlichkeit liegt auch mit dem Antibioticum LL-V 125 α vor, was sich in den nahezu identischen UV-Spektren in alkalischer Lösung niederschlägt (3.2.4.1.).

b) Antibiotische Wirkung

Angaben über antibakterielle oder antifungische Wirkung der hier zusammengestellten Diphenylether sind sehr selten; die wenigen Aussagen erscheinen pauschal. So wird für das Antibioticum LL-V 125 α eine schwach antifungische (McGahren et al., 1970), für die Produkte aus Braunalgen (Glombitza, 1977) und marinen Schwämmen (Burkholder und Sharma, 1969) eine antibakterielle Wirkung beschrieben.

c) Wirkung auf tierische Zellen

Während auf der einen Seite für die bekannten Diphenylether keine Wirkung auf Lymphocyten beschrieben wurde, stehen auf der anderen Seite Untersuchungen zur eventuellen cancerogenen Wirkung der Ethericine, wie sie von Steinhoff (1977) für den 4,4'-Diamino-diphenylether beschrieben wurden, noch aus.

d) Das Produzentenspektrum

Die besonders gut ausgeprägten biosynthetischen Fähigkeiten der Pilzgattung *Aspergillus*, die schon für Antibiotica beschrieben wurden (Bérdy, 1974; Heberle, 1974; Schanz, 1975), bestätigten sich auch bei der Bildung von Diphenylethern; mehr als 50 % der beschriebenen Verbindungen stammen von Vertretern dieser Gattung.

5.2. Wirkort und Wirkungsweise von Ethericin A

Untersuchungen zur Wirkungsweise von Antibiotica erweisen sich immer dann als besonders schwierig, wenn eine Reihe von Folgereaktionen die Primärreaktion überlagern (Franklin und Snow, 1975). Solche Schwierigkeiten treten vor allem auf, wenn

das Antibioticum an einem Ort angreift, wo mehrere Zellfunktionen lokalisiert sind. Eine dieser multifunktionalen Strukturen ist die Cytoplasmamembran (Osborn, 1971; Salton, 1974).

Die Befunde dieser Arbeit und ihr Vergleich mit ähnlichen Substanzen (Gale et al., 1972) lassen vermuten, daß Ethericin A an mit der Cytoplasmamembran verbundenen Strukturen angreift.

Einige Versuche wurden durchgeführt, um die Wechselwirkungen des Antibioticums mit mehrwertigen Ionen zu überprüfen, detailliertere Untersuchungen, z.B. der Komplexbildungskonstanten, stehen noch aus. Hinweise auf Komplexbildung ergaben sich aus folgenden Beobachtungen:

a) Antagonisierung der Wirkung von Ethericin A durch Ca^{2+}-Ionen im Streifengradienten-Test und teilweise Aufhebung dieser Wirkung durch Mg^{2+}-Ionen (3.4.6.1.)
b) Extraktion von Fe^{3+}-, jedoch nicht von Ca^{2+}-Ionen in die organische Phase (3.4.7.2.)
c) Wechselwirkung mit EDTA (3.4.6.2. und 3.4.6.3.).

Versuche an schwarzen Lipidfilmen brachten anfänglich eine Bestätigung der Wechselwirkung mit Calciumionen, ließen sich jedoch nicht eindeutig reproduzieren. Eine Reihe von Gründen können zur Erklärung herangezogen werden; so z.B. die Instabilität des Ethericin A, eine komplexe, von mehreren Faktoren (pH-Wert, Begleit-Ionen) abhängige Wirkung und die Verunreinigung eines der Präparate mit Fe(III)-Ionen. Diese können an schwarzen Lipidfilmen unspezifische Leitfähigkeitserhöhungen hervorrufen; was im Hinblick auf die nachgewiesenen Fähigkeiten des Ethericin A, mit Eisen(III)-Ionen Komplexe zu bilden (3.4.7.2.), die wahrscheinlichste Erklärung für die Nicht-Reproduzierbarkeit der Ergebnisse an Lipidfilmen sein könnte.

Phenole sind in der Lage, mit Fe^{3+}-Ionen Komplexe zu bilden, dies konnte auch für den Diphenylether Thyroxin (Abb. 23) nachgewiesen werden (Albert, 1973). Im folgenden soll jedoch im Vergleich mit anderen Diphenylethern, die wie Ethericin A Hydroxylgruppen in 2,2'-Stellung haben, gezeigt werden, daß

dadurch eine Komplexbildung möglich ist, die über das für Phenole übliche Maß hinausgeht.

Adams (1958) untersuchte die Metallkomplexe des Hexachlorophens (Abb. 25) und des entsprechenden Thioethers. Durch potentiometrische und colorimetrische Messungen konnte er zeigen, daß Hexachlorophen mit Fe^{2+}-, Fe^{3+}- und Cu^{2+}-Ionen Komplexe bildet, das Thioderivat zusätzlich mit Mn^{2+}- und Co^{2+}-Ionen. Für Ionen mit der Koordinationszahl 6 konnten oktaedrische 2:1-Komplexe nachgewiesen und z.T. isoliert werden. Für Cu^{2+}-Ionen wurden sowohl planare 1:1- als auch 2:1-Komplexe beschrieben. Die Komplexbildung erfolgte über die in 2,2'-Position stehenden Hydroxylgruppen und beim Thioether zusätzlich über das Brückenatom Schwefel.

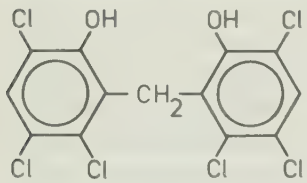


Abb. 25: Strukturformel von Hexachlorophen

Vergleiche mit Kalottenmodellen dieser Substanzen haben gezeigt, daß Ethericin A dem Thioether gleicht. Während Hexachlorophen eine nahezu freie Drehbarkeit der beiden Ringe um die Methylenbrücke besitzt, zeigen Ethericin A und der Thioether stärkere sterische Hinderungen. Da die freien Elektronenpaare des Sauerstoffs der Etherbrücke ebenso zur Verfügung stehen, wie beim Thioether, kann unter Einbeziehung der experimentellen Befunde eine Komplexbildung von Ethericin A mit mehrwertigen Ionen angenommen werden. Dabei könnte die Komplexstabilität sogar durch Wasserstoffbrücken über die in 3,3'-Position stehenden Hydroxylgruppen zusätzlich erhöht werden.

Betrachtet man die Hemmeffekte des Ethericin A, so wird ersichtlich, daß bei Einbauversuchen (in vivo) am stärksten die RNA-, dann die DNA- und die Protein-Synthese beeinflußt werden (3.4.1.). Die Übertragung dieser Versuche auf in vitro-Systeme ergab eine nur schwache Hemmung der "Poly-U abhängigen Poly-Phe Synthese", jedoch mit (für Ethericin A) niedrigen Konzentrationen eine Hemmung der DNA-Synthese (10 µg/ml ergaben 40 % Hemmung; 3.4.2.2.) und der DNA-abhängigen RNA-

Polymerase (28 µg/ml bewirkten 50 % Hemmung; 3.4.2.3.).
Sollte die Hemmwirkung von Ethericin A auf einer Komplexbildung mit mehrwertigen Ionen beruhen, so wäre anzunehmen, daß die oben genannten Enzymsysteme ionenabhängig sind.
Die DNA- und RNA-Polymerasen der hier verwendeten Testsysteme enthalten Zn^{2+}-Ionen, für ihre Aktivität sind Mg^{2+}- und Mn^{2+}-Ionen nötig (Pavletich et al., 1974).
Fraser und Creanor (1975) konnten zeigen, daß die RNA-Synthese in Hefen und die Aktivität isolierter RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* durch 8-Hydroxychinolin und das Antibioticum Lomofungin (5-Formyl-1-methoxycarbonyl-4,6,8-trihydroxyphenazin) sehr schnell gehemmt werden. Sie wiesen nach, daß Lomofungin Komplexe mit divalenten Kationen bildet und führten die Hemmwirkung auf Chelatbildung mit Mg^{2+}- und Mn^{2+}-Ionen zurück. Für 8-Hydroxychinolin hatten sie dies bereits früher nachgewiesen (Fraser und Creanor, 1974). Im Gegensatz zu diesen Autoren vermuten Pavletich und Mitarbeiter (1974), daß die Wirkung von Lomofungin bei *Saccharomyces* spec. auf Komplexbildung mit den Zn^{2+}-Ionen des Enzyms beruht. Zusätzlich haben sie eine Verstärkung der Hemmwirkung von Lomofungin durch EDTA nachgewiesen.

Es kann vermutet werden, daß Komplexbildner alle ionenabhängigen Prozesse hemmen, was auch für die DNA-Synthese zutreffen muß. Fraser und Creanor (1974) zeigten, daß 8-Hydroxychinolin die DNA-Synthese in *Schizosaccharomyces pombe* hemmt; Cannon und Jimenez (1974) wiesen nach, daß die DNA-Synthese bei *Saccharomyces cerevisiae* durch Lomofungin gehemmt wird. An isolierter DNA-Polymerase aus *Micrococcus luteus* konnten Pavletich und Mitarbeiter (1974) eine Hemmung durch Lomofungin (20 µg/ml) nachweisen.

Die Mg^{2+}-Ionen benötigende Protein-Synthese konnte in Hefezellen nicht sofort gehemmt werden. An Wirbeltierzellen ergab sich jedoch sowohl mit 8-Hydroxychinolin als auch mit Lomofungin eine genau so schnelle Hemmung der Protein-Synthese, wie der RNA-Synthese (Fraser und Creanor, 1975).
Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse weisen einige Übereinstimmungen mit den Arbeiten über Lomofungin und 8-Hydroxychinolin auf, so daß auch für Ethericin A ein Eingriff in die Funktion der DNA- und RNA-Polymerase vermutet

werden kann. Auch Adams und Hobbs (1958) vermuteten eine Hemmung ionenabhängiger Enzymsysteme durch Hexachlorophen und dessen Thioderivat.

Die Wirkung von Ethericin A durch Komplexbildung, die auch Hemmeffekte auf membrangebundene ATPase erklären kann, könnte jedoch von anderen Effekten des Antibioticums überlagert werden. So darf, obwohl kein Ausfluß von absorbierendem Material aus der Zelle festzustellen war, eine drastische Veränderung des Membrangefüges nicht ausgeschlossen werden. Die Zerstörung der Membranintegrität ist für Phenole bereits mehrfach beschrieben worden (Gale et al., 1972; Joswick et al., 1971). Eine weitere Wirkmöglichkeit ergibt sich aus der leichten Oxidierbarkeit und damit der reduzierenden Wirkung von Ethericin A; die daraus resultierende Verschiebung des Redoxgleichgewichts der Zelle könnte sich in einer Hemmung der Atmungskette oder der Aktivität von Oxidoreduktasen niederschlagen. Als Argument gegen eine Hemmung der Atmungskette kann jedoch das Ergebnis des Differenz-Tests mit *Pichia farinosa* (3.4.3.) gelten. Hinzu kommt noch, daß Komplexbildner das Redoxpotential beeinflussen können. Das Potential des Redoxpaares Fe^{2+}/Fe^{3+} wurde durch die Komplexbildung mit EDTA von +0,77 auf +0,14 erniedrigt (Albert, 1973), was im Falle des Ethericin A eine weitere Erhöhung der Reduktionsfähigkeit bedeuten könnte. Aufgrund der phenolischen Gruppen kann auch für Ethericin A eine ähnliche Wirkungsweise, wie sie für Ethericin B vermutet wird (5.3.), nicht ausgeschlossen werden. Dagegen sprechen jedoch die deutlich unterschiedlichen Hemmeffekte der beiden Antibiotica, wie sie beispielsweise bei den Makromolekülsynthesen in vitro zu finden sind.

Die aufgrund der ersten Ergebnisse an schwarzen Lipidfilmen, dem Wirkungsantagonismus durch Ca^{2+}-Ionen und Versuchen an Mäusemilzzellen vermutete Wirkung als Ca-Ionophor, konnte bis jetzt nicht bestätigt werden. Eine Widerlegung dieser Vorstellung ist aber nicht möglich, da auch für beschriebene Ionophore Wirkungen auf bestimmte Makromolekül-Synthesen bekannt sind. So hemmt z.B. der Porenbildner Gramicidin A die RNA-Polymerase aus *Bacillus brevis* und *Escherichia coli* (Sarkar et al., 1977),

der Ca-Ionophor A 23187 die Protein-Synthese in Zellkulturen (Glioma-Zellen aus Ratten; Bottenstein und de Vellis, 1976).

Ethericin A könnte nach dem hier Dargelegten eine Hemmung der DNA- und RNA-Polymerase durch Komplexbildung bewirken. Ob es sich dabei um den primären Effekt des Antibioticums handelt und inwieweit andere Mechanismen diesen Effekt überlagern, kann noch nicht entschieden werden.

5.3. Wirkort und Wirkungsweise von Ethericin B

Nach Gale und Mitarbeitern (1972) können membranaktive Substanzen aufgrund ihrer Wirkung in drei Klassen (a-c) eingeteilt werden.

a) Substanzen, die eine Veränderung des Membrangefüges hervorrufen.

wie in 3.4.4.2. gezeigt wurde, ruft Ethericin B einen Ausfluß von absorbierendem Material (260 und 280 nm) aus Zellen von *Bacillus subtilis* hervor. Dies deutet auf eine Störung des Membrangefüges hin, die jedoch nicht als primäre Ursache des Absterbens der Zellen betrachtet werden kann (Albert, 1973; Gale et al., 1972; Joswick et al., 1971). Hinweise auf Störungen der Cytoplasmamembran und der Zellwandsynthese ergeben sich nach Betina und Miceková (1973) auch aus der Bildung von Hyphenanomalien bei Pilzen. Ethericin B ruft bei *Botrytis cinerea* stark abnorme Verzweigungen ("Hexenbesen") hervor, so daß eine Membrandisturbation als sehr wahrscheinlich gelten kann.

b) Substanzen, welche spezifisch die Kationenpermeabilität verändern.

Im Gegensatz zu Ethericin A zeigt Ethericin B keinerlei Wechselwirkungen mit Kationen, eine ähnliche Wirkungsweise kann also ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den strukturellen Gegebenheiten (3.2.5.) überein.

c) Substanzen, die membrangebundene Enzyme des Energie-Transfers hemmen.

Ethericin B hemmt die vesikelgebundene ATPase aus *B. subtilis*

und *E. coli* (30 µg/ml ergaben 60 % Hemmung; 3.4.5.1.). Im Gegensatz zu Ethericin A konnte keine starke Abhängigkeit von der Dauer der Vorinkubation festgestellt werden (Abb. 17 und 18). Der Einfluß auf die membrangebundene ATPase könnte entweder auf einer spezifischen oder nichtspezifischen Enzymhemmung, sowie einer Störung des Membrangefüges beruhen. Für das letztere sprechen Versuche mit ATPase nach Hare (Detergens-behandelte Membranvesikel), wobei eine nur sehr schwache Hemmung festgestellt wurde.

Der Transport von Prolin in Membranvesikeln aus *Escherichia coli* wurde mit allerdings recht hohen Konzentrationen (100 µg/ml) von Ethericin B sehr stark gehemmt. Mit 10 µg/ml konnte jedoch nur eine sehr schwache Hemmwirkung erzielt werden (Abb. 19). Dies könnte darauf hindeuten, daß keine spezifische Transporthemmung vorliegt, sondern daß eine stark konzentrationsabhängige Membranveränderung sekundär auch eine Beeinflussung des aktiven Transports mit sich bringt. Einschränkend muß bemerkt werden, daß zu Ethericin B strukturell recht ähnliche Substanzen als Hemmstoffe des Lactose-Transports beschrieben wurden (Cirillo, 1972) und auch eine allgemeine Enzymhemmung nicht ausgeschlossen werden kann.

Gegen eine Enzymhemmung sprechen allerdings die Ergebnisse des Differenz-Tests mit *Pichia farinosa* (3.4.3.), wobei kein Einfluß von Ethericin B auf die Atmungskette festgestellt werden konnte. Inwieweit diese Ergebnisse aussagekräftig sind und sich auf Bakterien übertragen lassen, erscheint noch unklar.

Eine Möglichkeit, die sofortige Hemmung der Makromolekül-Synthesen in vivo zu erklären, ergibt sich, wenn man einen Eingriff in den Energiehaushalt und eine damit verbundene Hemmung des aktiven Transports, wie er von Luria (1975) für die Colicine beschrieben wurde, sowie eine Hemmung der ATPase-Aktivität annimmt. Eine zweite Möglichkeit wäre eine allgemeine Enzymhemmung, dagegen spricht jedoch der schwache Hemmeffekt von Ethericin B auf die DNA-Synthese in vitro und die isolierte RNA-Polymerase. Eine dritte Möglichkeit scheinen spezifischere Enzymhemmungen zu sein. Wedding und Mitarbeiter (1967) konnten zeigen, daß Phenole die Malat-Dehydrogenase aus Schwei-

neherz hemmen. Sie vermuteten einen primären Angriff an der NAD-Bindungsstelle des Enzyms. Auf der Basis der Hemmung von Dehydrogenasen ließe sich auch die Beeinträchtigung des Prolin-Transports erklären, da dieser bei *E. coli* primär mit einer membrangebundenen D-Lactat-Dehydrogenase gekoppelt ist (Walsh und Kaback, 1974).
Auf eine spezifischere Enzymhemmung deuten auch die Antagonisierung der Hemmwirkung durch Acetat bei *Pichia farinosa* und durch Citrat bei *Bacillus subtilis* hin. Hieraus kann auf einen Angriff im Bereich der Glykolyse und der oxidativen Decarboxylierung geschlossen werden. Hemmstoffe, die in diese Stoffwechselschritte eingreifen, wurden bereits beschrieben; so zum Beispiel das Makrolid-Antibioticum Chlorothricin als Hemmstoff der Pyruvat-Carboxylase (Schindler und Zähner, 1972) und Arenaemycin C als Hemmstoff der Pyruvat-Kinase (Keller-Schierlein et al., 1972).
Weitere Untersuchungen mit Ethericin B müssen zeigen, ob auch im Bereich der Glykolyse eine Dehydrogenase (Triosephosphat-Dehydrogenase) oder ein anderes Enzym besonders empfindlich sind.

5.4. Das Screening-Modell

Mit dem im Lehrbereich Mikrobiologie I, Universität Tübingen, entwickelten Screening-Modell (Zähner, 1977) wurde der Pilz *Aspergillus funiculosus* als bisher nicht bekannter Antibiotica-Produzent erkannt; die diesem Screening zugrundeliegenden Überlegungen sind in der Einleitung (1.) dargestellt.
Die Isolierung der antibiotischen Aktivitäten führte zu Ethericin A, das noch ca. 10 % einer nicht untersuchten isomeren Nebenkomponente enthält, und zu Ethericin B. Nur Ethericin A kann als direktes Ergebnis des Screenings betrachtet werden, da Ethericin B keinerlei Wechselwirkungen mit EDTA erkennen läßt.

Der im primären Screening verwendete Testkeim *Streptomyces viridochromogenes* wurde durch *Bacillus subtilis* ersetzt, welcher sich mit zunehmender Reinigung als sensitiver erwies. Um Ansatzpunkte zur Erklärung dieser Verschiebung zu finden, wurden vergleichende Untersuchungen zur Empfindlichkeit der beiden Testkeime gegen eine erhöhte Wasserstoffionenkonzentration durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß *S. viridochromogenes* wesentlich empfindlicher auf eine Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration reagiert als *B. subtilis*. Das Fermentationsmedium nach Raulin-Thom hat einen pH-Wert von 3,7, der im Verlauf der Fermentation auf Werte um pH 2,5 sinkt. Die bessere Wirkung beim primären Test kann deshalb als Überlagerung der Effekte von Antibioticum und H^+-Ionenkonzentration gedeutet werden. Ethericin B wurde in diese Überlegungen nicht einbezogen, da es infolge der geringen Konzentrationen keinen nennenswerten Einfluß besitzt.

In 3.4.6.3. wurde gezeigt, daß EDTA die Wirkung von Ethericin A verstärken kann. Da es sich hierbei um eine allgemeine Zellschädigung durch EDTA handeln kann und deshalb Hemmstoffe besser eindringen und wirken könnten, wurden Kreuztests mit verschiedenen Antibiotica durchgeführt (3.4.6.2.). Nur ein Teil der getesteten Antibiotica wurde durch EDTA in der Wirkung verstärkt. Dabei handelte es sich, neben Ethericin A, um die Antibiotica A 22765, Albomycin (Zähner, 1977), Magnesidin (Gandhi et al., 1973) und Oxytetracyclin (Franklin und Snow, 1975). Nicht verstärkt wurde die Wirkung von Ferrimycin (Zähner, 1977) und Desferri-Triacetylfusigen (Anke, 1977).

Alle diese Antibiotica stehen in enger Beziehung zu mehrwertigen Ionen (siehe Zitate). Aufgrund der nur geringen Zahl der Versuche und der einleitend (1.) dargestellten Komplexität der EDTA-Wirkung soll hier nicht versucht werden, dieses Ergebnis zu interpretieren. Zumindest konnte gezeigt werden, daß EDTA keinen allgemeinen Effekt auf die Wirkung aller Antibiotica gegen *Bacillus subtilis* hat, sondern daß unter den hier getesteten Hemmstoffen nur die verstärkt wurden, welche in enger Beziehung zu mehrwertigen Ionen stehen.

Mit dem EDTA-Screening scheint also, wie aus dem oben dargestellten hervorgeht, ein Beispiel der Korrelation von primärem Test und Wirkungsweise der resultierenden Substanz gefunden worden zu sein. Dies bedarf jedoch einer Bestätigung durch die Untersuchung weiterer diesem Screening enstammender Antibiotica.

5.5. Immunologische Untersuchungen

Neben einer großen Anzahl von Mitogenen sind auch antibiotisch aktive Substanzen als Lymphocyten-stimulierende Agentien beschrieben worden. Hierzu gehören zum Beispiel die beiden porenbildenden, mit Sterolen in Wechselwirkung tretenden Polyenantibiotica Nystatin und Amphotericin B. Dabei lagen die Stimulationsindices des Thymidin-Einbaus für Nystatin (10 µg/ml) bei 3 und für Amphotericin B (10 µg/ml) bei 6-7. Die Stimulation beruhte auf einer Transformation von B-Zellen; dies konnte erstens mit genetisch athymischen, nackten Mäusen und zweitens durch immunologisch angereicherte B-Lymphocyten nachgewiesen werden. Präparationen angereicherter T-Lymphocyten wurden nicht stimuliert (Hammarström und Smith, 1976; Ishikawa et al., 1977).

Auch der Calcium-Ionophor A 23187 kann Lymphocyten zur Proliferation anregen; so wurden Lymphocyten aus Schweinelymphknoten optimal bei einer A 23187-Konzentration von 0,8 µg/ml stimuliert (Maino et al., 1974). Lymphocyten aus menschlichem Blut konnten ebenfalls zur Proliferation gebracht werden (Luckasen et al., 1974; Jensen und Rasmussen, 1977). Bei allen Untersuchungen wurde ein drastischer Abfall des Thymidin-Einbaus sowie Zell-Lyse festgestellt, wenn die optimale Konzentration des Mitogens überschritten wurde. Daraus wird ersichtlich, daß die optimal stimulierende und die lysierende Dosis des Mitogens eng beieinander liegen. Aus der Tatsache, daß ionophore Substanzen in der Lage sind, Lymphocyten zu stimulieren, schlossen einige Arbeitsgruppen, daß Ionen bei der Transformation eine maßgebliche Rolle spielen (Jensen und Rasmussen, 1977; Maino et al., 1974). Andererseits könnte der geringe Unterschied zwischen Stimulations- und Zelltötungsdosen auch darauf

hinweisen, daß die Zelltransformation durch Membrandisturbation zustande kommt (Luckasen et al., 1974).
Durch das hier bearbeitete Antibioticum Ethericin A (0,1 µg/ml) wurde der Einbau von [^{3}H]-Thymidin in Lymphocyten aus Mäusemilz signifikant erhöht. Die Stimulation ist relativ schwach, der Stimulationsindex liegt bei 3. Ethericin B hatte keinen Effekt auf die Transformation von Mäusemilzzellen.

Ethericin A ruft demnach in geringen Konzentrationen ähnliche Effekte wie die anderen Antibiotica hervor. So darf man wohl schließen, daß Ethericin A entweder aufgrund seiner membrandisturbierenden Potenz oder aufgrund seiner vermuteten ionophoren Eigenschaften eine Lymphocyten-Transformation hervorruft. Weitere Versuche müssen noch klären, ob es sich bei Ethericin A ebenfalls um ein B-Zellmitogen handelt, oder ob andere Zelltypen stimuliert werden.
Im Gegensatz zur schwachen Eigenstimulation wird die Con A-Stimulation durch geringe Mengen von Ethericin A (0,1 µg/ml; Reststimulation 5 %) stark gehemmt. Dies könnte auf einer Schädigung der Con A-stimulierten Lymphocyten-Subpopulation beruhen, so daß noch Untersuchungen zur Zahl der lebensfähigen Zellen nach Inkubation mit Ethericin A durchgeführt werden sollten.

Von Saito und Mitarbeitern (1973) wurde beschrieben, daß das Tripeptid Leupeptin (Acetyl- oder Propyl-L-Leu-L-Leu-L-Arginal), ein spezifischer Proteasehemmer, eine 30 - 40 %ige Hemmung der PHA-Stimulation hervorruft. Die Autoren folgern, daß den Proteasen eine erhebliche Bedeutung bei den frühen Vorgängen der Transformation zukommt. Als Erklärung der Hemmung bieten sie zwei Hypothesen an: a) die Protease-abhängige Bildung einer stimulierenden Substanz wird verhindert; b) PHA ermöglicht das Eindringen des Proteasehemmers in die Zellen.
Im Gegensatz zur Wirkung von Leupeptin erhöht jedoch das Dipeptid Bestatin [(2S,3R)-3-Amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl)-(S)-leucin], ein Hemmstoff von Aminopeptidasen, den Con A-Effekt um 40 % (Saito et al., 1977).
Für Ethericin A wurde bisher keine Proteasehemmung nachgewiesen. Allerdings kann ein zellschädigender Effekt nicht ausge-

schlossen werden, zumal die Con A-Behandlung, ähnlich wie bei Leupeptin, die Wirkung erst ermöglichen könnte.
Ein Vergleich der durch Ethericin A hervorgerufenen Hemmeffekte mit denen einiger bekannter Ionophoren ergab wesentliche Übereinstimmungen. Die Antibiotica Valinomycin (0,01 µg/ml), A 23187 und Gramicidin A (beide 0,1 µg/ml) unterdrückten die Stimulationseffekte von PHA und Lipopolysaccharid sehr stark, während Alamethicin und Nystatin (je 10 µg/ml) nur sehr schwache Wirkung hervorriefen (Rosenstreich und Blumenthal, 1977). Eine mitogene Wirkung dieser Antibiotica konnten die Autoren nicht feststellen. Darüber hinaus fanden sie, daß die meisten B-Zellmitogene keine ionophoren Eigenschaften besitzen. Einige hochmolekulare Proteine mit mitogenen Fähigkeiten zeigten zwar ionophore Eigenschaften, verloren diese jedoch - unter Erhalt der Mitogenität - nach kurzem Erhitzen. Die Schlußfolgerung von Rosenstreich und Blumenthal war, daß mitogene Wirkung nicht unbedingt mit ionophoren Eigenschaften verknüpft sein muß.
Andere Autoren fanden im Gegensatz dazu stimulierende Effekte von Nystatin (Ishikawa et al., 1977), A 23187 (Hammarström und Smith, 1976) und Alamethicin (W. Bessler, persönliche Mitteilung). Es besteht somit über die Kopplung von mitogener und ionophorer bzw. porenbildender Wirkung noch keine Klarheit.

Ethericin A gleicht also in seinen Hemmeigenschaften besonders dem Ionophor A 23187, allerdings weichen die in unserem System erhaltenen Stimulationsindices von denen des Ionophors ab. Nach allen Befunden könnten bei Ethericin A sowohl seine membrandisturbierenden, seine eventuellen ionophoren Eigenschaften als auch Kombinationen dieser Eigenschaften eine Rolle spielen. Eine Entscheidung darüber erscheint erst möglich, wenn Klarheit über die einleitenden Vorgänge der Transformation herrscht.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Kulturfiltrat des Pilzes *Aspergillus funiculosus* konnten mit Hilfe einer neuen Screening-Methode zwei antibiotisch aktive Substanzen isoliert werden. Es handelt sich um den 2,2',-3,3'-Tetrahydroxy-5,5'-dimethyldiphenylether Ethericin A und um Ethericin B mit der wahrscheinlichen Struktur eines 4'-Carboethoxy-3,3'-dihydroxy-5,5'-dimethyldiphenylethers. Außerdem wurde ein Isomer von Ethericin A nachgewiesen, jedoch bisher auf seine biologische Wirkung nicht untersucht.
Die Reinigung der Antibiotica erfolgte durch Säulenchromatographie an Amberlite XAD-2, Kieselgel 60 und Sephadex LH-20.

Ethericin A und B hemmen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie Pilze. Das Wirkungsspektrum beider Antibiotica ist breit; besonders sensitive Organismengruppen konnten nicht erkannt werden, Pilze scheinen gegen Ethericin B empfindlicher zu sein als gegen Ethericin A.
An Mäusemilzzellen wurde eine schwache, jedoch signifikante Stimulation des Thymidin-Einbaus durch Ethericin A (0,1 µg/ml) nachgewiesen. Die durch Concanavalin A ausgelöste Lymphocyten-Transformation wurde hingegen durch Ethericin A (0,1 µg/ml) nahezu vollständig verhindert. Ethericin B hatte keinen Einfluß auf Mäusemilzzellen.
In Versuchen zur Wirkungsweise konnte eine Wechselwirkung von Ethericin A mit mehrwertigen Ionen wahrscheinlich gemacht werden. Vermutlich als Folge werden besonders die DNA- und RNA-Synthese gehemmt, was durch Einbauversuche in vivo, Untersuchungen an RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* und an einem in vitro-Test der DNA-Synthese bei *Bacillus subtilis*, gezeigt werden konnte. Inwieweit diese Wirkungen durch andere Effekte, z.B. einen Eingriff in das Redoxgleichgewicht der Zelle, überlagert werden, erscheint unklar.

Für Ethericin B kann neben einer Membrandisturbation eine Hemmung von Enzymen angenommen werden. Ob es sich dabei um eine spezifische Hemmung von Dehydrogenasen handelt, oder ob besonders sensitive Enzyme im Bereich der Glykolyse und der oxidativen Decarboxylierung zu suchen sind, ist noch nicht geklärt.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Adams, J.B.: The mode of action of chlorinated bisphenol antibacterials. Part I. Metal chelates of hexachlorophene and thiobisdichlorphenol. J. Pharm. Pharmacol. 10, 507-515 (1958)

Adams, J.B., Hobbs, M.: The mode of action of chlorinated bisphenol antibacterials. Part II. Biological studies. J. Pharm. Pharmacol. 10, 516-520 (1958)

Albert, A.: Selective toxicity. The physico-chemical basis of therapy. London: Chapman and Hall 1973

American society of biological chemists, Inc.: Collected tentative rules and recommendations of the commission on biochemical nomenclature IUPAC-IUB and related documents. Bethesda: 1975

Andersson, J., Melchers, F.: Lymphocyte stimulation by Concanavalin A. In: Concanavalin A as a tool (H. Bittiger, H.P. Schnebli, eds.), pp. 505-522. London-New York-Sydney-Toronto: John Wiley and sons 1976

Anke, H.: Metabolic products of microorganisms. 163. Desferritriacetylfusigen, an antibiotic from *Aspergillus deflectus*. J. Antibiotics 30, 125-128 (1977)

Asahani, Y., Shibata, S.: Chemistry of lichen substances. Tokyo: Soc. Prom. Sci. 1954

Ballantine, J.A., Hasall, C.H., Jones, B.D.: The biosynthesis of phenols - XVII. Some phenolic metabolites of mutant strains of *Aspergillus rugulosus*. Phytochemistry 7, 1529-1534 (1968)

Bayer, M.E., Leive, L.: Effect of ethylenediaminetetraacetate upon the surface of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 130, 1364-1381 (1977)

Bérdy, J.: Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. Adv. Appl. Microbiol. 18, 309-406 (1974)

Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Graßl, M., Michal, G.: Ermittlung von Messergebnissen. In: Methoden der enzymatischen Analyse, Vol. 1 (H.U. Bergmeyer, ed.), pp. 273-280. Weinheim: Verlag Chemie 1970

Bessler, W., Braun, V.: Mitogenität von Lipoprotein aus der äußeren Membran von *E. coli* gegenüber Lymphozyten verschiedener Spezies. Z. Immun.-Forsch. 150, 193 (1975)

Bessler, W., Resch, K., Hancock, E., Hantke, K.: Induction of lymphocyte proliferation and membrane changes by lipopeptide derivatives of the lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. Z. Immun.-Forsch. 153, 11-22 (1977a)

Bessler, W.G., Schimmelpfeng, L., Peters, J.H.: Potentiation of mitogen-induced lymphocyte stimulation by polyethylene glycols. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 1253-1260 (1977b)

Betina, V., Mičeková, D.: Morphogenetic activity of cytochalasins, cyanein, and monorden in *Botrytis cinerea*. Z. Allg. Mikrobiol. 13, 287-298 (1973)

Bonifas, V.: Détermination de l'association synergique binaire d'antibiotes et de sulfamides. Experientia 8, 234-235 (1952)

Bottenstein, J.E., de Vellis, J.: Divalent cation ionophore A 23187: A potent protein synthesis inhibitor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 486-493 (1976)

Braun, V.: Membranpermeation und Antibiotika-Resistenz bei Bakterien. Naturwissenschaften 64, 126-132 (1977)

Brufani, M., Keller-Schierlein, W., Loeffler, W., Mansperger, I., Zähner, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 69. Mitteilung: Über das Venturicidin B, das Botrycidin und die Zuckerbausteine der Venturicidine A und B. Helv. Chim. Acta 51, 1293-1304 (1968)

Burkholder, P.R., Sharma, G.M.: Antimicrobial agents from the sea. Lloydia 32, 466-483 (1969)

Cannon, J.R., Cresp, T.M., Metcalf, B.W., Sargent, M.V., Elix, J.A.: Structural revision and synthesis of a novel fungal diaryl ether. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 473 (1971)

Cannon, M., Jimenez, A.: Lomofungin as an inhibitor of nucleic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 142, 457-463 (1974)

Cirillo, V.P.: Inhibition of transport reactions. B. Sugars. In: Metabolic inhibitors. A comprehensive treatise, Vol. III (R.M. Hochster, M. Kates, J.H. Quastel, eds.), pp. 47-68. New York-London: Academic Press 1972

Costerton, J.W., Cheng, K.-J.: The role of the bacterial cell envelope in antibiotic resistance. J. Antimicrob. Chemother. 1, 363-377 (1975)

Davis, B.D., Mingioli, E.S.: Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B_{12}. J. Bacteriol. 60, 17-28 (1950)

Documenta Geigy: Wissenschaftliche Tabellen. Stuttgart: Thieme 1975

Franklin, T.J., Snow, G.A.: Biochemistry of antimicrobial action. London: Chapman and Hall 1975

Fraser, R.S.S., Creanor, J.: Rapid and selective inhibition of RNA synthesis in yeast by 8-hydroxyquinoline. Eur. J. Biochem. 46, 67-73 (1974)

Fraser, R.S.S., Creanor, J.: The mechanism of inhibition of ribonucleic acid synthesis by 8-hydroxyquinoline and the antibiotic lomofungin. Biochem. J. 147, 401-410 (1975)

Gale, E.F., Cundliffe, E., Reynolds, P.E., Richmond, M.H., Waring, M.J.: The molecular basis of antibiotic action. London-New York-Sydney-Toronto: John Wiley and sons 1972

Gandhi, N.M., Nazareth, J., Divekar, P.V., Kohl, H., De Souza, N.J.: Magnesidin, a novel magnesium-containing antibiotic. J. Antibiotics 26, 797-798 (1973)

Glombitza, K.-W.: Antibakteriell wirksame Substanzen aus Süß- und Meerwasseralgen. Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium 25, 133-136 (1977)

Glombitza, K.-W., Koch, M., Eckhardt, G.: Polyhydroxyphenyl-äther aus *Laminaria ochroleuca*. Phytochemistry 15, 1082-1083 (1976b)

Glombitza, K.-W., Koch, M., Eckhardt, G.: Chlorierte Phlorethole aus *Laminaria ochroleuca*. Phytochemistry 16, 796-798 (1977b)

Glombitza, K.-W., Rauwald, H.-W., Eckhardt, G.: Phlorotannine aus *Himanthalia elongata*. Phytochemistry 16, 1614 (1977a)

Glombitza, K.-W., Rösener, H.-U.: Bifuhalol: Ein Diphenyläther aus *Bifurcaria bifurcata*. Phytochemistry 13, 1245-1247 (1974)

Glombitza, K.-W., Rösener, H.-U., Koch, M.: Polyhydroxyoligophenyle und Phenyläther aus *Bifurcaria bifurcata*. Phytochemistry 15, 1279-1281 (1976a)

Glombitza, K.-W., Rösener, H.-U., Müller, D.: Bifuhalol und Diphlorethol aus *Cystoseira tamariscifolia*. Phytochemistry 14, 1115-1116 (1975)

Glombitza, K.-W., Sattler, E.: Trifuhalol, ein neuer Triphenyldiäther aus *Halidrys siliquosa*. Tetrahedron Lett. 4277-4280 (1973)

Goldfine, H.: Comparative aspects of bacterial lipds. Adv. Microb. Physiol. 8, 1-58 (1972)

Grove, J.F.: Simple carbocyclic phenols derived by the acetate-polymalonate pathway. In: Handbook of microbiology, Vol. III (A.I. Laskin, H.A. Lechevalier, eds.), pp. 169-182. Cleveland, Ohio: CRC Press 1973

Halder, A., Bose, S.K.: Reversal of mycobacillin inhibition reactions by sterols and phospholipids. J. Antibiotics 24, 779-784 (1971)

Hammarström, L., Smith, E.: Mitogenic properties of polyene antibiotics for murine B cells. Scand. J. Immunol. 5, 37-43 (1976)

Hanson, R.L., Kennedy, E.P.: Energy-transducing adenosine triphosphatase from *Escherichia coli*: Purification, properties and inhibition by antibody. J. Bacteriol. 114, 772-781 (1973)

Haque, H., Russell, A.D.: Effect of ethylendiaminetetraacetic acid and related chelating agents on whole cells of gram-negative bacteria. Antimicrob. Ag. Chemother. 5, 447-452 (1974a)

Haque, H., Russell, A.D.: Effects of chelating agents on the susceptibility of some strains of gram-negative bacteria to some antibacterial agents. Antimicrob. Ag. Chemother. 6, 200-206 (1974b)

Hare, J.F.: Purification and characterization of a dicyclohexyl-carbodiimide-sensitive adenosine triphosphatase complex from membranes of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 1329-1337 (1975)

Harold, F.M.: Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. Bacteriol. Rev. 36, 172-230 (1972)

Harold, F.M.: Membranes and energy transduction in bacteria. Curr. Top. Bioenerg. 6, 83-149 (1976)

Harold, F.M., Altendorf, K.H., Hirata, H.: Probing membrane transport mechanisms with ionophores. Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 149-160 (1974)

Hartmann, G., Behr, W., Beissner, K.-A., Honikel, K., Sippel, A.: Antibiotika als Hemmstoffe der Nukleinsäure- und Proteinbiosynthese. Angew. Chem. 80, 710-718 (1968)

Heberle, W.: Asposterol, ein Antibiotikum aus *Aspergillus microcysticus*. Untersuchungen zur Isolierung, Charakterisierung und Wirkungsweise. Dissertation, Universität Tübingen (1974)

Hütter, R., Keller-Schierlein, W., Nüesch, J., Zähner, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 48. Mitteilung: Scopamycine. Arch. Mikrobiol. 51, 1-8 (1965)

Humphries, S.G.: The biosynthesis of tannins. In: Biogenesis of natural compounds (P. Bernfeld, ed.), pp. 801-827. Oxford: Pergamon Press 1967

Huneck, S., Lamb, I.M.: 1'-Chloropannarin, a new depsidone from *Argopsis friesiana:* Notes on the structure of pannarin and on the chemistry of the lichen genus *Argopsis.* Phytochemistry 14, 1625-1628 (1975)

Ishikawa, H., Narimatsu, H., Saito, K.: Mechanism of the adjuvant effect of nystatin on in vitro antibody response of mouse spleen cells: Indication of nystatin as a B-cell mitogen and as a stimulant for polyclonal antibody synthesis in B cells. Microbiol. Immunol. 21, 137-152 (1977)

Jensen, P., Rasmussen, H.: The effect of A 23187 upon calcium metabolism in the human lymphocyte. Biochim. Biophys. Acta 468, 146-156 (1977)

Joswick, H.L., Corner, T.R., Silvernale, J.N., Gerhardt, P.: Antimicrobial actions of hexachlorophene: Release of cytoplasmic materials. J. Bacteriol. 108, 492-500 (1971)

Juillard, M.: Über Cobalamine einer Mutante von *Bacillus megaterium* De Bary. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene 110, 701-727 (1957)

Kaback. H.R.: Transport studies in bacterial membrane vesicles. Science 186, 882-892 (1974)

Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Für Mediziner und Naturwissenschaftler. Stuttgart: Thieme 1972

Kates, M.: Techniques in lipidology. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Vol. 3 (T.S. Work, E. Work, eds.), pp. 269-610. Amsterdam-London: North-Holland 1972

Kavanagh, F.: Analytical microbiology. New York-London: Academic Press 1963

Keller-Schierlein, W., Lemke, J., Nyfeler, R., Zähner, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 105. Mitteilung: Arenaemycin E, D und C. Arch. Mikrobiol. 84, 301-316 (1972)

Kessler, C., Hartmann, G.R.: The two effects of rifampicin on the RNA polymerase reaction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 50-56 (1977)

Kneifel, H., König, W.A., Loeffler, W., Müller, R.: Ophiocordin, an antifungal antibiotic of *Cordyceps ophioglossoides*. Arch. Microbiol. 113, 121-130 (1977)

Knippers, R.: Molekulare Genetik. Stuttgart: Thieme 1971

Konnings, W.N., Bisschop, A., Veenhuis, M., Vermeulen, C.A.: New procedure for the isolation of membrane vesicles of *Bacillus subtilis* and an electron microscopy study of their ultrastructure. J. Bacteriol. 116, 1456-1465 (1973)

Konnings, W.N., Freese, E.: Amino acid transport in membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. 247, 2408-2418 (1972)

Kunze, B.: Lipomycine, neue polyenartige Antibiotika aus *Streptomyces aureofaciens*. Untersuchungen zur Wirkungsweise. Dissertation, Universität Tübingen (1975)

Läuger, P.: Carrier-mediated ion transport. Science 178, 24-30 (1972)

Leive, L.: The barrier function of the gram-negative envelope. Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 109-127 (1974)

Levy, S.B., McMurry, L.: Detection of an inducible membrane protein associated with R-factor-mediated tetracycline resistance. Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 1060-1068 (1974)

Loeffler, W.: Ein einfaches Verfahren zum Erkennen von Dermatophyten. In: Diagnostik und Therapie der Pilzkrankheiten und neuere Erkenntnisse in der Biochemie der pathogenen Pilze (H. Götz, H. Rieth, eds.), pp. 207-234. Berlin: Grosse 1970

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

Luckasen, J.R., White, J.G., Kersey, J.H.: Mitogenic properties of a calcium ionophore, A 23187. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 5088-5090 (1974)

Luria, S.E.: Colicins and the energetics of cell membranes. Scientific American 233, 30-37 (1975)

Mahmoodian, A., Stickings, C.E.: Studies in the biochemistry of micro-organisms. 115. Metabolites of *Penicillium frequentans* Westling: Isolation of sulochrin, asterric acid, (+)-bis-dechlorogeodin and two new substituted anthraquinones, questin and questinol. Biochem. J. 92, 369-378 (1964)

Maino, V.C., Green, N.M., Crumpton, M.J.: The role of calcium ions in initiating transformation of lymphocytes. Nature 251, 324-327 (1974)

Matsushita, T., White, K.P., Sueoka, N.: Chromosome replication in toluenized *Bacillus subtilis* cells. Nature New Biology 232, 111-114 (1971)

Mayer, W.: Dehydro-digallussäure. Ann. (Liebigs) 578, 34-44 (1952)

McGahren, W.J., Andres, W.W., Kunstmann, M.P.: A novel diaryl ether, LL-V 125 α, from a fungus of the order sphaeropsidales. J. Org. Chem. 35, 2433-2435 (1970)

Melchers, F., Braun, V., Galanos, C.: The lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli:* A B-lymphocyte mitogen. J. Exp. Med. 142, 473-482 (1975)

Moses, R.E., Richardson, C.C.: Replication and repair of DNA in cells of *Escherichia coli* treated with toluene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 674-681 (1970)

Natori, S., Nishikawa, H.: Structures of osoic acids and related compounds, metabolites of *Oospora sulphurea-ochracea* v. Beyma. Chem. Pharm. Bull. 10, 117-124 (1962)

Neu, H.C., Winshell, E.B.: Lack of synergy of EDTA with antimicrobials in resistant enterobacteriaceae. Nature 225, 763 (1970)

Nicolson, G.L.: Concanavalin A: The tool, the techniques and the problems. In: Concanavalin as a tool (H. Bittiger, H.P. Schnebli, eds.), pp. 3-15. London-New York-Sydney-Toronto: John Wiley and sons 1976

Nöll, G.: Modellmembranen - Membranmodelle. Biologie in unserer Zeit 6, 65-74 (1976)

Nüsslein, V., Klein, A.: DNA replication in the cellophane membrane system. In: Methods in molecular biology, Vol. 7 (A.I. Laskin, J.A. Last, eds.), pp. 163-179. New York: Marcel Dekker Inc. 1975

Osborn, M.J.: The role of membranes in the synthesis of macromolecules. In: Structure and function of biological membranes (L.I. Rothfield, ed.), pp. 343-400. New York-London: Academic Press 1971

Pache, W., Zähner, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 76. Mitteilung: Bindung von Antibiotica an Lipoprotein. Arch. Mikrobiol. 66 281-288 (1969)

Pavletich, K., Kuo, S.-C., Lampen, J.O.: Chelation of divalent cations by lomofungin: role in inhibition of nucleic acid synthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 942-950 (1974)

Pfeiffer, D.R., Lardy. H.A.: Ionophore A 23187: The effect of H^+ concentration on complex formation with divalent and monovalent cations and the demonstration of K^+ transport in mitochondria mediated by A 23187. Biochemistry 15, 935-943 (1976)

Poralla,K.: Zur Wirkungsweise des makrolidartigen Antibiotikums Borrelidin und typischer Makrolid-Antibiotika. Dissertation, Universität Tübingen (1967)

Raistrick, H., Rudman, P.: Studies in the biochemistry of micro-organisms. 97. Flavipin, a crystalline metabolite of *Aspergillus flavipes* (Bainier and Sartory) Thom and Church and *Aspergillus terreus* Thom. Biochem. J. 63, 395-405 (1956)

Reed, P.W., Lardy, H.A.: A 23187: A divalent cation ionophore. J. Biol. Chem. 247, 6970-6977 (1972)

Rennie, E.H., Cooke, W.T., Finlayson, H.H.: An investigation of the resin from species of *Xanthorrhoea* not previously examined. J. Chem. Soc. Transactions 117, 338-350 (1920)

Reusser, F.: Streptolydigin, an inhibitor of oxydative phosphorylation in rat liver mitochondria. J. Bacteriol. 100, 1335-1341 (1969)

Rosenstreich, D.L., Blumenthal, R.: Ionophorous activity and murine B lymphocyte mitogens. J. Immunol. 118, 129-136 (1977)

Russell, A.D.: Ethylenediaminetetra-acetic acid. In: Inhibition and destruction of the microbial cell (W.B. Hugo, ed.), pp. 209-224. London-New York: Academic Press 1971

Saito, M., Aoyagi, T., Umezawa, H., Nagai, Y.: Bestatin, a new specific inhibitor of aminopeptidases, enhances activation of small lymphocytes by concanavalin A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 526-533 (1977)

Saito, M., Yoshizawa, T., Aoyagi, T., Nagai, Y.: Involvement of proteolytic activity in early events in lymphocyte transformation by phytohemagglutinin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 569-575 (1973)

Salton, M.R.J.: Membrane associated enzymes in bacteria. Adv. Microb. Physiol. 11, 213-283 (1974)

Sarkar, N., Langley, D., Paulus, H.: Biological function of gramicidin: Selective inhibition of RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1478-1482 (1977)

Schanz, D.: Isolierung und Charakterisierung eines Antibioticums aus *Aspergillus funiculosus*. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1975)

Schindler, P.W., Zähner, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 96. Mitteilung: Wirkungsweise des Makrolid-Antibioticums, Chlorothricin. I. Hemmer der Pyruvat-Carboxylase aus *Bacillus subtilis*. Arch. Mikrobiol. 82, 66-75 (1972)

Sharma, G.M., Vig, B.: Studies on the antimicrobial substances of sponges. VI. Structures of two antibacterial substances isolated from the marine sponge *Dysidea herbacea*. Tetrahedron Lett. 1715-1718 (1972)

Sharon, N., Lis, H.: Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177, 949-959 (1972)

Shaw, N.: Lipid composition as a guide to the classification of bacteria. Adv. Appl. Microbiol. 17, 63-108 (1974)

Siddhikol, C., Erbstoeszer, J.W., Weisblum, B.: Mode of action of streptolydigin. J. Bacteriol. 99, 151-155 (1969)

Spicer, A.B., Spooner, D.F.: The inhibition of growth of *Escherichia coli* spheroplasts by antibacterial agents. J. Gen. Microbiol. 80, 37-50 (1974)

Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967

Steinhoff, D.: Cancerogene Wirkung von 4,4'-Diamino-diphenyl-äther bei Ratten. Naturwissenschaften 64, 394 (1977)

Suzuki, K., Nawata, Y., Ando, K.: Tetranactin, a new miticidal antibiotic. V. Quantitative determination of macrotetrolide antibiotics. J. Antibiotics 24, 675-679 (1971)

Takeshima, H., Okamoto, M., Komiyama, K., Umezawa, I.: Mechanism of action of acetyl kidamycin. I. Interaction with DNA. Biochim. Biophys. Acta 418, 24-28 (1976)

Thaler, M.: Veränderung der Membranzusammensetzung bei *Brevibacterium ammoniagenes* unter Manganmangel als Voraussetzung für die extrazelluläre Nucleotidsynthese. Dissertation, Universität Tübingen (1977)

Traub, P., Nomura, M.: Structure and function of *E. coli* ribosomes, V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 777-784 (1968)

Turner, W.B.: Fungal metabolites. London-New York: Academic Press 1971

Vichkanova, S.A., Tolkachev, O.N., Makarova, L.V., Tsizin, Y.S.: Structure and anti-tubercular activity of some diphenyl esters. Russian Pharmacol. Toxicol. 37, 273-278 (1974)

Walsh, C.T., Kaback, H.R.: Membrane transport as a potential target for antibiotic action. Ann. N.Y. Acad. Sci. 235, 519-541 (1974)

Ward, J.B.: Tunicamycin inhibition of bacterial wall polymer synthesis. Febs Lett. 78, 151-154 (1977)

Wedding, R.T., Hansch, C., Fukuto, T.R.: Inhibition of malate dehydrogenase by phenols and the influence of ring substituents on their inhibitory effectiveness. Arch. Biochem. Biophys. 121, 9-21 (1967)

West, I.C.: Lactose transport coupled to proton movements in *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 655-661 (1970)

Wilhelm, J.M., Oleinick, N.L., Corcoran, J.W.: The inhibition of bacterial RNA synthesis by the rifamycin antibiotics. Biochim. Biophys. Acta 166, 268-271 (1968)

Wolf, H.: Kirromycin, ein Hemmstoff der Funktion der ribosomalen 30S-Untereinheit. Dissertation, Universität Tübingen (1971)

Wolf, H., Chinali, G., Parmeggiani, A.: Mechanism of the inhibition of protein synthesis by kirromycin. Role of elongation factor Tu and ribosomes. Eur. J. Biochem. 75, 67-75 (1977)

Wolf, H., Zähner, H., Nierhaus, K.: Kirromycin, an inhibitor of the 30 S ribosomal subunits function. Febs Lett. 21, 347-350 (1972)

Yamamoto, Y., Nitta, K., Oohata, Y., Furukawa, T.: Studies on the metabolic products of a strain of *Aspergillus fumigatus* DH 413. V. A new metabolite produced by ethionine inhibition. Chem. Pharm. Bull. 20, 931-935 (1972)

Zähner, H.: Biologie der Antibiotica. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965

Zähner, H.: Einige Aspekte der Antibiotica-Forschung. Angew. Chem. 89, 696-703 (1977)

Zähner, H.: New antibiotics. Post. Hig. I Med. Dosw. 28, 459-469 (1974)

Zähner, H., Maas, W.K.: Biology of antibiotics. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1972

Zillig, W., Fuchs, E., Milette, R.: DNA-dependent RNA polymerase. In: Procedures in nucleic acid research (G.L. Cantoni, D.R. Davies, eds.), pp. 323-339. New York-Evanston-London: Harper and Row 1966

L e b e n s l a u f

16.08.1947	geboren in Stuttgart
1954 - 1958	Grundschule in Stuttgart
1958 - 1967	Schickhardt-Gymnasium, Stuttgart
13.06.1967	Reifeprüfung am Schickhardt-Gymnasium
01.10.1967	Wehrdienst in Rendsburg, Schleswig-Holstein (18 Monate)
14.04.1969	Biologie-Studium an der Universität Stuttgart
02.03.1972	Diplomvorprüfung an der Universität Stuttgart
09.04.1972	Biologie-Studium an der Universität Tübingen
14.07.1975	Diplomhauptprüfung

Anschließend Anfertigung der Dissertation: "Antibiotica aus *Aspergillus funiculosus*. Untersuchungen zur Isolierung, Charakterisierung und Wirkungsweise" am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Professor Dr. W. Loeffler.

Meine akademischen Lehrer waren:

In Stuttgart: A. Arnold, H. Bredereck,
K. Jeremias, H. Kneser,
H. Krebs, U. Kull,
E. Möhn, H.-M. Müller,
A. Wagner, H. Wermuth.

In Tübingen: E. Bayer, V. Braun,
H. Diekmann, U. Feine,
J. Guglielmi, E. Kallee,
O. Klee, W. Loeffler,
H. Pape, E. Sander,
B. Schwemmle, G. Weitzel,
U. Weser, H. Zähner.